

Gülfem ERSOY HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ (TIP) YÜKSEK LİSANS 2017



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ (TIP)  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SIÇANLARDA MEZENŞİMAL KÖK HÜCRENİN  
İMLANTASYON BÖLGESİNDEKİ LAMİNİN, KALSİTONİN  
VE  $\alpha$ V $\beta$ 3 İNTEGRİNE ETKİSİ

Gülfem ERSOY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. N. Tülün BOYLU

AYDIN-2017

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SIÇANLARDA MEZENŞİMAL KÖK HÜCRENİN**  
**İMLANTASYON BÖLGESİNDEKİ LAMİNİN,**  
**KALSİTONİN VE  $\alpha$ V $\beta$ 3 İNTEGRİNE ETKİSİ**

**Gülfem ERSOY**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Yrd. Doç. Dr. N. Tülün BOYLU**

**İKİNCİ DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-16020 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2017**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

### KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Gülfem ERSOY tarafından hazırlanan "Sıçanlarda Mezenşimal Kök Hücrenin İmplantasyon Bölgesindeki Laminin, Kalsitonin ve  $\alpha\upsilon\beta 3$  İntegrine Etkisi" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/01/2017

Üye (Tez Danışmanı) :	Yrd. Doç. Dr. N. Tülün BOYLU	ADÜ Tıp. Fak.
Üye	: Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN	ADÜ Tıp. Fak.
Üye	: Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN	DEÜ Tıp. Fak.
Üye	: Prof. Dr. Yücel KOCA BAŞIMOĞLU	ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Üye	: Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN	ADÜ Tıp. Fak.

*(Handwritten signatures in blue ink)*

#### ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün .....tarih ve .....sayılı oturumunda alınan .....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. N. Tülün BOYLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültürü aşamalarında laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan bilgi ve deneyimlerini paylaşan ikinci tez danışmanım Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e teşekkürlerimi sunarım.

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e, Deneysel hayvanları laboratuvarında bilgisini ve yardımını esirgemeyen Sayın Vet. Serdar AKTAŞ'a, Laborant Sayın Şirin ADIGÜZEL'e teşekkürlerimi sunarım. Lisans eğitimim boyunca Histoloji ve Embriyolojiyi sevmemi sağlayan, tez çalışmamda desteğini esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yücel BAŞIMOĞLU KOCA'ya teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında manevi desteğini hissettiğim, bilgilerimi paylaşan hayatımda olduğu için kendimi her zaman şanslı hissettiğim, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Selda KAHVECİ'ye, histolojik çalışmalarda yardımlarını gördüğüm, tez çalışmalarında her zaman yanımda olan, Yüksek Lisans Öğrencisi H. Fulya YILMAZ'a, hücre kültürü aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans Öğrencisi Betül KARTAL ve Hatice PİLEVNELİ'ye, Adü Fen-Edebiyat Fakültesi Yüksek Lisans Öğrencisi Nazlı KARA'ya, Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğrencilerinden manevi desteğini her zaman hissettiğim tez çalışmalarımda yol gösteren Erdoğan KOPARAN'a ve tez çalışmalarında her zaman yanımda olan ve manevi desteğini hep hissettiğim Merve ÇAĞIL'a, tezimin istatistiksel analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalında Arş. Gör. Afra Alkan'a, Adü Deneysel Hayvanları çalışanlarına ve Adü Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen, yoluma ışık tutan, hayattaki en büyük hazinelerim olan, annem Saliha BEYOĞLU'na, kardeşim Gülden ERSOY'a ve bana her zaman yol gösteren, manevi desteğini hep hissettiğim dedem Selehattin BEYOĞLU'na ve anneannem Bedriye BEYOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
RESİMLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ .....	ix
EKLER DİZİNİ .....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Uterus .....	2
2.1.1. Uterus Anatomisi .....	2
2.1.2. Uterus Histolojisi .....	2
2.1.3 Uterus Embriyolojisi .....	3
2.1.4. Plasenta .....	3
2.2. Endometriyal (Menstruel) Siklus .....	3
2.2.1. Proliferasyon (Foliküler) Fazı .....	4
2.2.2. Sekresyon (Luteal) Fazı .....	4
2.2.3. Menstruasyon Fazı .....	4
2.3. İmplantasyon Öncesi Dönemde Meydana Gelen Endometriyal Luminal Epitel ve Stromal Değişiklikler .....	4
2.3.1. Endometriyal Reseptivite .....	5
2.4. İmplantasyon .....	5
2.4.1. Apozisyon (Yakınlaşma) .....	6
2.4.2. Adezyon (Bağlanma) .....	6
2.4.3. İnvazyon ve Penetrasyon .....	6
2.4.3.1. Yer Değiştirerek Penetrasyon .....	6
2.4.3.2. Kaynaşarak Penetrasyon .....	7
2.4.3.3. Zorla Penetrasyon .....	7
2.5. İmplantasyonda Desidualizasyon .....	7
2.6. Kalsitonin Hormonu ve İmplantasyondaki Yer .....	8

2.7. Bazal Membran Bileşenleri .....	9
2.7.1. Laminin .....	9
2.8. Adezyon Molekülleri .....	9
2.8.1. $\alpha$ V $\beta$ 3 İntegrin .....	10
2.9. Kök Hücre .....	10
2.9.1. Mezenşimal Kök Hücreler .....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	13
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları .....	13
3.1.1. Deney Grupları .....	13
3.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenşimal Kök Hücre Elde Edilmesi: .....	14
3.2.1. Hücre Kültür İşlemleri: .....	14
3.2.1.1. Red Floresan Proteinle ( RFP ) Mezenşimal Kök Hücrelerin İşaretlenmesi .....	15
3.2.1.2. Hücre Canlılık Testi .....	15
3.2.1.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Akım Sinometrik Analizi .....	15
3.3. İmmunofloresan İnceleme .....	16
3.4. Dokuların Elde Edilmesi .....	17
3.5. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Takibi .....	17
3.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü .....	17
3.6. İmmunohistokimyasal İnceleme .....	18
3.7. İstatiksel Analiz .....	20
4. BULGULAR .....	22
4.1. Hücre Kültürü ve İmmünofenotiplendirilmesi .....	22
4.1.1. Sıçan kemik iliğinden izole edilmiş mezenşimal kök hücrenin kültür ve immünofenotiplendirilmesi .....	22
4.1.2. Akım Sinometrisi Yöntemiyle CD 34 Sayımı .....	24
4.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Varlığının RFP pozitifliği ile ölçülmesi .....	24
4.3. 10 Günlük Hematoksilen-Eozin Histokimyasal Bulguları .....	27
4.4. 10 Günlük İmmunohistokimyasal Bulgular .....	28
4.4.1 Laminin 10 günlük kontrol grubu bulguları: .....	28
4.4.2. Laminin 10 günlük kök hücre grubu bulguları: .....	29
4.4.3. Kalsitonin 10 günlük kontrol grubu bulguları .....	30
4.4.4. Kalsitonin 10 günlük kök hücre grubu bulguları .....	31
4.4.5. $\alpha$ V $\beta$ 3 İntegrin 10 günlük kontrolü grubu bulguları .....	32
4.4.6. $\alpha$ V $\beta$ 3 10 günlük kök hücre grubu bulguları .....	33

4.5. 21 Günlük Hematoksilen-Eozin Histokimyasal Bulguları .....	34
4.6. 21 Günlük İmmüno histokimyasal Bulguları .....	35
4.6.1. Laminin 21 günlük kontrol grubu bulguları .....	35
4.6.2. Laminin 21 günlük kök hücre grubu bulguları.....	36
4.6.3. Kalsitonin 21 günlük kontrol grubu bulguları .....	37
4.6.4. Kalsitonin 21 günlük kök hücre grubu bulguları.....	38
4.6.5. $\alpha$ V $\beta$ 3 İntegrinin 21 günlük kontrol grubu bulguları .....	39
4.6.6. $\alpha$ V $\beta$ 3 İntegrinin 21 günlük kök hücre grubu bulguları.....	40
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	44
KAYNAKLAR.....	45
EKLER .....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	59

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin monofosfat
<b>CGRP</b>	: Kalsitonin gen ilişkili peptid
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>DAPI</b>	: 4', 6-diamino-2-phenylindole
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler matriks proteini
<b>FITC</b>	: Flouresein izotiosiyonat
<b>H-E</b>	: Hematoksilen-eozin
<b>HSCORE</b>	: Histolojik skorlama
<b>MEM</b>	: Minumum essential medium
<b>PBS</b>	: Fosfat tuzu tamponu
<b>RFP</b>	: Red flouresan protein
<b>Tripsin- EDTA</b>	: Tripsin-Etilendiamin tetraasaetikasit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İmplantasyon .....	7
Şekil 2. Kök hücrelerin sınıflandırılması .....	11
Şekil 3. Sıçan kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin immünofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. ....	23
Şekil 4. Mezenşimal kök hücre verilmiş akciğer dokusundaki CD 34 sayımı.....	24



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenşimal kök hücrelerin ışık mikroskopundaki 3. pasajdaki görüntüsü. ....	22
<b>Resim 2.</b> 21 günlük sıçan uterusunun parafine gömülmüş kesitine ait implantasyon bölgesinde kök hücre varlığının immünofloresan mikroskopuyla görüntülenmesi .....	25
<b>Resim 3.</b> 21 günlük sıçan uterusunun frozen kesitine ait implantasyon bölgesinde kök hücre varlığının immünofloresan mikroskopuyla görüntülenmesi.....	26
<b>Resim 4.</b> 10 günlük hematoksilen-eozin bulguları.....	27
<b>Resim 5.</b> 10 günlük kontrol grubu uterusuna ait laminin immunohistokimyasal boyamaları. ....	28
<b>Resim 6.</b> 10 günlük kök grubu uterusuna ait laminin immunohistokimyasal boyamaları. ....	29
<b>Resim 7.</b> 10 günlük kontrol grubu uterusuna ait kalsitonin immunohistokimyasal boyamaları. ....	30
<b>Resim 8.</b> 10 günlük kök hücre grubu uterusuna ait kalsitonin immunohistokimyasal boyamaları. ....	31
<b>Resim 9.</b> 10 günlük kontrol grubu uterusuna ait $\alpha V\beta 3$ integrine ait immunohistokimyasal boyamaları.....	32
<b>Resim 10.</b> 10 günlük kök hücre grubu uterusuna ait $\alpha V\beta 3$ integrine ait immunohistokimyasal boyamaları.....	33
<b>Resim 11.</b> 21 günlük H-E boyamaları.....	34
<b>Resim 12.</b> 21 günlük kontrol grubu uterusuna ait laminin immunohistokimyasal boyamaları. ....	35
<b>Resim 13.</b> 21 günlük kök hücre grubu uterusuna ait laminin immunohistokimyasal boyamaları. ....	36
<b>Resim 14.</b> 21 günlük kontrol grubu uterusuna ait kalsitonin immunohistokimyasal boyamaları. ....	37
<b>Resim 15.</b> 21 günlük kök hücre grubu uterusuna ait kalsitonin immunohistokimyasal boyamaları. ....	38
<b>Resim 16.</b> 21 günlük kontrol grubu uterusuna ait $\alpha V\beta 3$ integrin immunohistokimyasal boyamaları. ....	39

**Resim 17.** 21 günlük kök hücre grubu uterusuna ait  $\alpha V\beta 3$  integrin immunohistokimyasal boyamaları.....40



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Laminin, Kalsitonin ve $\alpha V\beta 3$ İntegrinin Kontrol ve Kök Hücre gruplarında şiddet ekspresyonunun skorlanması .....	20
<b>Tablo 2.</b> Laminin, Kalsitonin ve $\alpha V\beta 3$ İntegrinin Kontrol ve Kök Hücre gruplarında yoğunluk ekspresyonlarının skorlanması .....	20



## EKLER DİZİNİ

- Ek 1.** 10 günlük gruplar arasında Laminin, Kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrin immünoekspresyonunun skorlama sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi.....50
- Ek 2.** 21 günlük gruplar arasında Laminin, Kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrin immünoekspresyonunun skorlama sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi..... 53
- Ek 3.** 10 günlük Gebe Sıçan Gurupları Arasında Laminin, Kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrin immunekspresyonun Histoskorlama sonucu elde edilen değerleri..... 56
- Ek 4.** 21 günlük gebe sıçan grupları arasında Laminin, Kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrin immunekspresyonun Histoskorlama sonucu elde edilen değerleri..... 57
- Ek 5.** Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ..... 58

## ÖZET

### SIÇANLARDA MEZENŞİMAL KÖK HÜCRENİN İMPLANTASYON BÖLGESİNDEKİ LAMİNİN, KALSİTONİN VE $\alpha V\beta 3$ İNTEGRİNE ETKİSİ

**Ersoy G. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.**

Uterusa embriyonun tutunmasıyla birlikte implantasyon gerçekleşir. İmplantasyon sırasında uterusu yapısal ve morfolojik olarak bir takım olaylar meydana gelir. Bağ dokusu bileşenlerinden olan lamininin, embriyonik gelişim ve plasenta oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Tiroit bezinden salgılanan kalsitonin hormonunun, implantasyon sırasında uterusu otokrin ve parakrin etki gösterdiği bilinmektedir. Endometriyumun luminal epitelinde en iyi karakterize edilen hücre adezyon molekülü  $\alpha V\beta 3$  integrindir. Bu verilerden yola çıkarak bu çalışmada sıçanlarda mezenşimal kök hücrenin implantasyon bölgesindeki laminin, kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrine etkisini immunohistokimyasal yöntemle göstermeyi amaçladık.

Çalışmamızda 16 erişkin “*Wistar Albino*” dişi rat gebeliğin 10. Gününde deney ve kontrol olmak üzere 2 farklı gruba ayrıldı. Sıçan kemik iliğinden elde ettiğimiz MKH’ler 8 sıçana verildi. Kontrol grubunda olan 8 sıçana Phosphate Buffered Saline (PBS) verildi. Aynı işlemler 21 günlük gebe sıçanlar içinde yapıldı. Çalışmaya dahil edilen toplam 32 adet “*Wistar Albino*” dişi ratın implantasyon bölgeleri ve plasentaları çıkarıldı. Tespit edildikten sonra bu örnekler laminin, kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrin için immunohistokimyasal yöntemlerle gösterildi.

10 günlük gebe sıçanlarda; lamininin immünlokalizasyonunda, deney ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farkın olmadığı görüldü. Kalsitoninin immünlokalizasyonuna bakıldığında, deney grubunda desidual hücrelerin etrafında zayıf immünreaktivite gösterirken, kontrol grubunda orta şiddette immünreaktivite göstermiştir.  $\alpha V\beta 3$  integrinin immunolokalizasyonunda, damar duvarı ve bez epitelinin etrafında kontrol grubunda orta şiddette immünreaktivite gözlenirken, deney grubunda zayıf şiddette immünreaktivite görüldü.

21 günlük gebe sıçanlarda; laminin immünlokalizasyonu deney grubunda bez epitelinde zayıf şiddette immünreaktivite gösterirken, kontrol grubunda orta şiddette immünreaktivite gözlenmiştir. Kalsitoninin ve  $\alpha V\beta 3$  integrinin immünlokalizasyonunda, deney ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farkın olmadığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak; 21 günlük gebe sıçanlarda, deney grubunda, laminin immünlokalizasyonunda bez epiteli zayıf Şiddette immünreaktivite göstermesine karşın 10 günlük gebe sıçanlarda orta Şiddette immünreaktivite göstermiştir. Kalsitonin immnlokalizasyonu gebeliğin 21. gününde stromal hücrelerde orta Şiddette immünreaktivite gösterirken, gebeliğin 10. gününde stromal hücrelerde zayıf Şiddette immünreaktivite göstermiştir. 21 günlük gebe sıçanlarda,  $\alpha V\beta 3$  integrinin immünlokalizasyonunda ise, trofoblastik dev hücreler zayıf immünreaktivite göstermiştir. Gebeliğin 10. gününde,  $\alpha V\beta 3$  integrinin immnlokalizasyonuna bakıldığında, trofoblastik dev hücrelerde orta Şiddette immünreaktivite görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** İmplantasyon, Mezenşimal Kk Hücre, Laminin, Kalsitonin,  $\alpha V\beta 3$  integrin

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS TO LAMININ, CALSITONIN, $\alpha V\beta 3$ INTEGRIN IN THE IMPLANTATION AREA OF RATS

**Ersoy G. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Histology-Embryology (Medicine) Programme Master's Thesis, Aydın, 2017.**

Implantation occurs with the attachment of the embryo to uterus. During the implantation, of structural and morphologic events are occurs in uterus. Laminin, a component of connective tissue, is known to play a role in embryonic development and placenta formation. It is known that the hormone of calcitonin secreted from the thyroid gland has autocrine and paracrine effect on the uterus during implantation. The best characterized cell adhesion molecule in the luminal epithelium of the endometrium is  $\alpha V\beta 3$  integrin. From this data, we aimed to demonstrate the effect of mesenchymal stem cells to laminin, calcitonin and  $\alpha V\beta 3$  integrin in the implantation region of rats by immunohistochemical method.

In our study 16 adult "Wistar Albino" female rats were divided into two different subgroups as control and experiment groups on the 10th day of gestation. The MSCs which were obtained from rat bone marrow were given to 8 rats. Phosphate Buffered Saline (PBS) was given to 8 rats which were in the control group. The same procedures were performed for 21-day-old pregnant rats. A total of 32 "Wistar Albino" female rats were included to the study and their implantation areas and the placentas were taken. Then, these samples were immunohistochemically assayed for laminin, calcitonin and  $\alpha V\beta 3$  integrin.

It is seen that, there is no significant differences in 10 days pregnant rats for Laminin immunolocalization between control and experimental groups. When the calcitonin was examined for immunolocalization, weak immunoreactivity was seen around the decidual cells in the experimental group but moderate-intensity immunoreactivity in the control group. In the immunolocalization of  $\alpha V\beta 3$  integrin, moderate-intensity immunoreactivity was observed around the vessel wall and gland epithelium in the control group while weak intensity immunoreactivity was seen in the experimental group.

In 21 day pregnant rats; weak immunoreactivity was seen for lamin immunolocalization in the gland epithelium of experimental group while control group showed modarete immunoreactivity in the gland epithelium. There was no significant difference no between the control and experimental groups for calcitonin and  $\alpha V\beta 3$  integrin immunocalization.

As a result; In 21-day-old pregnant rats, laminin immunolocalization showed weak immunoreactivity in the glandular epithelium of experimental group but moderate immunoreactivity was seen in 10-day-old pregnant rats. Immunocalization of calcitonin in stromal cells of 21-day-old pregnant rats showed moderate immunoreactivity but weak immunoreactivity in 10-day-old pregnant rats. In 21-day-old pregnant rats, giant trophoblastic cells showed weak immunoreactivity for  $\alpha V\beta 3$  integrin immunolocalization. On the 10th day of gestation, giant trophoblastic cells showed moderate-intensity of immunoreactivity for  $\alpha V\beta 3$  integrin immunolocalization.

**Key Words:** Implantation, Mesenchymal Stem Cell, Laminin, Calcitonin,  $\alpha V\beta 3$  integrin



# 1. GİRİŞ

İmplantasyon, embriyonun özelleşmiş hücreleri olan trofoektodermin uterusun özelleşmiş dokularına temasıyla başlayan uyumlu bir olaydır (Carson ve ark, 2000). Apozisyon, adezyon ve invazyon olmak üzere 3 aşamada gerçekleşir (Achache ve Revel, 2006).

Blastosist implantasyonunu destekleyen endometriyal farklılaşma, progesteron ve östrojen tarafından sağlanır. Endometriyumda çeşitli yapısal, hücresel, moleküler olaylar implantasyon penceresi denilen bölgede ortaya çıkar. Bunun sonucunda endometriyumun kabulünü sağlayan gerekli elemanlar ortaya çıkar (Gökçimen ve Temel, 2004).

Bazal membran; doku bütünlüğü, doku tamirinde ve özellikle embriyonik dönemde hücrenin büyümesi, farklılaşması, çoğalması, göçü gibi bazı temel hücre fonksiyonlarında önemli rol oynar (Vatansever ve ark, 2001). İmplantasyon döneminde blastosist üzerinde morfolojik olarak saptanabilen tüm membranlarda laminin bulunur (Kayışlı ve ark, 2000).

Kalsitonin, 32 aminoasitlik bir peptit hormonudur ve parafoliküler C hücrelerinden salgılanır. İmplantasyon sırasında sıçan rahminde geçici süre eksprese edilmektedir (Zhu ve ark, 1998).

Adezyon moleküllerinden integrinler, embriyolojik gelişim, hemostazis, yara iyileşmesi, immün ve immün olmayan savunma mekanizmaları gibi birçok fizyolojik olayda rol oynar. Bunun yanı sıra hücre-hücre ve hücre- matriks adezyonuna katılırlar. Fertilizasyon, implantasyon ve ilk blastula oluşumunu içeren erken gelişimsel olaylarda önemli rol oynarlar (Özcan, 2010).

Mezenşimal kök hücreler yer aldıkları dokunun hücre tiplerine dönüşebilen, stromal kökenli ve multipotent özelliğe sahip erişkin kök hücrelerdir (Liu ve ark, 2014). Homeostazın ve doku onarımının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Hwang ve ark,2009).

Bu verilerden yola çıkarak sıçanlarda gebeliğin 10. ve 21. günlerinde laminin, kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrinin mezenşimal kök hücre uygulamasıyla implantasyon bölgesindeki etkisini, immünohistokimyasal yöntemle göstermeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Uterus

#### 2.1.1. Uterus Anatomisi

Anatomik olarak uterus; gövde (korpus), uterus kavitesinin daraldığı iç ağız (internal os) ile iç ağızdan aşağıya doğru inen silindirik yapıdaki serviks ve uterusun kubbe şeklinde uzanan kubbe biçimli kısmı fundusu içeren armut şeklinde bir organdır (Junqueira ve Carneiro, 2003). Paramezonefrik kanalların birleşmiş alt bölümlerinden köken alan uterusun; abdominal bölümü tuba uterinayla, pelvik bölümü ise vagina ile birleşir (Arıncı ve Elhan,2006). Gebelik esnasında uterusun hacmi, şekli ve pozisyonu değişmekle beraber, doğumdan sonra eski durumuna döner (Ozan, 2005).

#### 2.1.2. Uterus Histolojisi

Uterus duvarı histolojik olarak içten dışa doğru; endometriyum (tunika mukoza), miyometriyum (tunika muskularis), perimetriyum (tunika seroza) olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır (Erdost, 2011).

Endometriyum; uterusun en iç tabakasıdır. Geç blastosist döneminde zigotun gömülmesi için ortam hazırlar ve plasentanın anneye ait olan kısmını oluşturur (Şeftalioğlu,1998). Epitel ve lamina propriadan oluşmaktadır. Tek katlı silindirik epitelle döşelidir ve devamında basit tübüler endometriyal bezleri içerir. Lamina propria; kollajen, retiküler lifler ve çok sayıda bağ dokusu hücresi içermektedir (Başımoğlu Koca, 2012) İşlevsel olarak; fonksiyonel tabaka ve bazal tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur. Menstruasyon sırasında dökülen yüzeyde bulunan tabakaya fonksiyonel tabaka adı verilirken, menstruasyondan sonra yenilecek olan, fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturan kısma bazal tabaka adı verilir (Abraham ve Kierszenbaum, 2006).

Miyometriyum; birbirine bağlı kas demetlerini ve bol miktarda kan damarı içeren ortadaki en kalın tabakadır. Bağ dokusuyla birbirinden ayrılan demetlerin sınırları tam ayırt edilemeyen üç tabaka şeklinde düzenlenmiştir. İç ve dış tabakadaki hücreler genellikle longitudinal seyirliken orta tabakadakiler oblik ve sirküler seyirlidir (Ovale ve Nahirney,

2009). Gebelikte içinde bulunan düz kas hücrelerinin uzayabilme özelliğine sahip olması nedeniyle, hipertrofi ve hiperplazi göstermektedir (Özer ve İzzetoğlu, 2010). Gebelik sırasında, ovaryum ve plasentadan salgılanan relaksin hormonu, miyometriyal kontraksiyonların baskılanmasını sağlar. Doğum sırasındaki miyometriyal kasılmalar nörohipofizden salgılanan, oksitosin hormonunun kontrolündedir (Abraham ve Kierszenbaum, 2006).

Perimetrium; mezotelyumdan ve ince bir bağ dokusu tabakasından meydana gelen dış seröz tabakadır (Ross ve Pawlina, 2014). Az sayıda düz kas hücreleri içermesine rağmen çok sayıda lenf, kan damarı ve sinir telleri içerir (Erdost, 2011).

### **2.1.3. Uterus Embriyolojisi**

Dişilerde genital kanallar parametonefrik kanallardan gelişmektedir. Karın boşluğuna açılan kranial vertikal parça, mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal kısım, karşı taraftan gelen eşiyile birleşen kaudal vertikal kısım olmak üzere başlangıçta her kanalda tanımlanabilir 3 kısım bulunmaktadır. Overlerin aşağıya doğru inmesiyle birlikte ilk iki kısımdan uterus tüpleri gelişir, kaudal parçalarda uterus kanalını oluşturmak için kaynaşır (Sadler, 2011).

### **2.1.4 Plasenta**

Plasenta; anne ile fetüs arasındaki iletişimi sağlayan, fetüsün büyüme ve gelişmesi için vazgeçilemez olan hayati bir organdır (Cha ve ark, 2012). Dördüncü ayın başında, koriyon frondozum tarafından oluşturulan fetal parça ve desidua bazalisten oluşan maternal parça olmak üzere birbirini tamamlayan iki kısımdan oluşmaktadır. Temel işlevleri anne ve bebek arasındaki gaz değişimi, besin maddelerinin değişimini sağlamak ve progesteron hormonunu üretmektir (Sadler, 2011).

## **2.2. Endometriyal (Menstruel) Siklus**

Endometriyum; pubertenin başlamasından menopoza kadar olan süreçte; periyodik, morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler göstermektedir. 28 gün ara ile tekrarlanan ve çeşitli hormonlarla kontrol edilen bu değişikliklere “menstruel siklus” adı verilir. Ard arda devam eden üç fazdan meydana gelmektedir (Gartner ve Hatt, 2008) .

### **2.2.1. Proliferasyon (Foliküler) Fazı**

Olgunlaşan ovaryum foliküllerinde üretilen östrojenin etkisiyle, endometriyumun kalınlığının arttığı, epiteldeki ve lamina propriyadaki hücrelerde mitoz bölünmenin görüldüğü evredir. Bu evreye östrojenik veya foliküler evrede denmektedir. Tübüler bezlerin epitel hücreleri yukarı doğru göç etmeye başlar. Böylece bezler daralır ve kıvrımlı bir yapı oluşturur (Abraham ve Kierszenbaum, 2006) .

### **2.2.2. Sekresyon (Luteal) Fazı**

Ovulasyondan bir veya iki gün sonra endometrium kalınlaşmaya başlar. Kalınlığı 5-6 mm'e ulaşan endometriumda; bezler genişlemiş, keseler oluşturmuş ve salgı üretmeye başlamıştır. Östrojen ve progesteron hormonlarının etkisiyle, stromal hücreler glikojen bakımından zengin olan, desidua hücrelerine dönüşürler. Spiral arterler uzar (Gürsoy ve Ergin, 2007) .

### **2.2.3. Menstruasyon Fazı**

Fertilizasyon olmazsa; ovaryumdan progesteron ve östrojen salgılanması azalır, stratum fonksiyonale'de kan desteğinde değişimler olur. Bunun sonucunda, oosit ovulasyon sonucu bir miktar kanla birlikte atılır. Venlerin açık olan uç kısımlarında menstruel kanama boyunca yaklaşık 35-50 ml kan sızar. Menstruel kanama ortalama beş gün sürmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

Ovulasyon olmadığı takdirde, korpus luteum oluşmadığı için progesteron üretilemez. Progesteron yokluğunda sekretuar safhaya giremeyen endometrium; menstruasyona kadar proliferasyon safhasında kalır (Gürsoy ve Ergin, 2007) .

## **2.3. İmplantasyon Öncesi Dönemde Meydana Gelen Endometriyal Luminal Epitel ve Stromal Değişiklikler**

İmplantasyona hazırlık olmak üzere menstruel safhanın sonunda endometrium bezlerinde artış görülür. Ovulasyon sonucu oluşan korpus luteumdan progesteron salgılanır ve endometrium kalınlaşarak ödem oluşturur, stroma hücreleri şişer, spiral arterler gruplaşır (Erdost, 2011) .

Progesteron hormonu etkisinde olan sekreuar fazda ise epitel hücrelerin apikal yüzeyinde oluşmuş silya benzeri uzantılar şeklinde 'pinopod' olarak isimlendirilen yapılar yer alır. Östrojen ve progesteron, stromal hücrelerin; glikojen bakımından zengin, büyük ve solgun olan, fibroblasttan farklılaşan desidua hücrelerine dönüşmesini sağlar. Desidualizasyon evresi, implantasyon olmasa da implantasyon penceresi döneminde endometrial stromada gerçekleşir (Gürsoy ve Ergin, 2007).

### **2.3.1. Endometriyal Reseptivite**

Endometriyumda çeşitli yapısal, hücrel ve moleküler olaylar dizisi implantasyon penceresi ile kontrol edilirken bunun sonucunda endometrial reseptiviteyi sağlayan gerekli elemanlar ortaya çıkabilir (Bahar ve ark, 2012). İmplantasyon penceresi 28 günlük menstruel siklusun 20-23. günleri ile sınırlanmıştır. Uterus boşluğuna uzanan epitelyal hücrelerin apikal membranları, mikrovilluslarını kaybeder. Bunun yerine 'pinopod' olarak adlandırılan geniş ve düz membran uzantıları gelişmektedir. Pinopodlar reseptivitenin morfolojik belirteçlerindedir. Reseptivitenin biyokimyasal belirteçlerinden östrojen ve progesteronun faaliyetleri bilinirken bunun yanı sıra matriks metaloproteinazlar, adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks proteinleri ve homeoboks genlerinin faaliyetleri tam olarak bilinmemektedir (Bahar ve Baykal, 2008).

### **2.4. İmplantasyon**

Çoğu türlerde üremenin en önemli basamağını temsil eden dinamik bir süreçtir. Yaklaşma, adhezyon ve invazyon olmak üzere 3 aşamadan meydana gelmektedir. İmplantasyon gerçekleşmeden önce blastokist polarite gösterir. Embriyonik implantasyon ve gelişimin çeşitli düzeylerinde gerekli olan polarite, öncelikle gelişen blastokist ve oosit içerisindeki embriyonik hücrelerin differansiyasyonu için önemlidir. Polaritenin ikinci aşamasında blastokist endometriyuma yaklaşır ve endometriyuma belirli bir yönelim gösterir. Blastokist yöneldikten sonra (yaklaşma), zona pellusidasını kaybeder ve trofoblast hücreleri reseptif endometriyal epitele bağlanır (adhezyon). Son olarak blastokist stromaya invaze olur(Şekil 1). Adhezyon ve invazyon sırasında embriyo ile anne arasında görülen moleküler etkileşimler embriyonun implante olabilmesi için hayati önem taşımaktadır (Diedrich ve ark, 2007).

#### **2.4.1. Apozisyon (Yakınlaşma)**

Blastosist hareketsizdir. Trofoblastlar ile uterinal epitel hücreleri birbirine değler ve ileri bir yakınlaşma olur. Bu alandaki her iki epitel yüzeyinde geçici pseudopod benzeri sitoplazmik çıkıntılar aracılığıyla intersellüler gap'lar oluşur. Endometrial epitelde mikrovilli düzleşmesi ve glikokaliks kaybı gözlenirken trofoblastta fagositik aktivite gözlenmektedir ( Demir, 1995).

#### **2.4.2. Adezyon (Bağlanma)**

Trofoblast ve glandüler epitel arasında ilişki artık daha da sıkılaşmıştır. Blastosistin endometriuma fiksasyonu ve glandüler epiteldeki apikal mikrovillusların trofoblast membranlarında, bunlara uyan çukurcuklara bağlanmasını sağlar. Burada desmozom denilen özel hücre bağlantıları vardır (Madazlı, 2008).

#### **2.4.3. İnvazyon ve Penetrasyon**

Blastokist implante olduğu sırada daha fazla trofoblast endometriyuma temas ederek sitotrofoblast ve sinsityotrofoblasta farklılaşır. Sitotrofoblast tabakası, mitotik olarak aktif ve yeni hücreler oluşturabilen tabakadır. Mitotik aktivite sonucunda oluşan yeni hücreler giderek büyüyen sinsityotrofoblast kitlesine göç eder. Daha sonra burada birleşerek hücre zarını kaybederler. Sinsityotrofoblast tabakası hızla genişleyerek çok çekirdekli bir kitle olur ve hücre sınırları belirgin değildir. Sinsityotrofoblast hücreleri ilerleyerek, endometriyumun bağ dokusuna invaze olur ve blastokist endometriyum içine gömülür. Endometrial hücreler apoptozise uğrar. Apoptozis sonucu endometriyum epitel hücrelerini bağlayan desmozomların sayıca giderek azalması sonucunda penetrasyon kolaylaşır (Abraham ve Kierszenbaum, 2006).

##### **2.4.3.1. Yer Değiştirerek Penetrasyon**

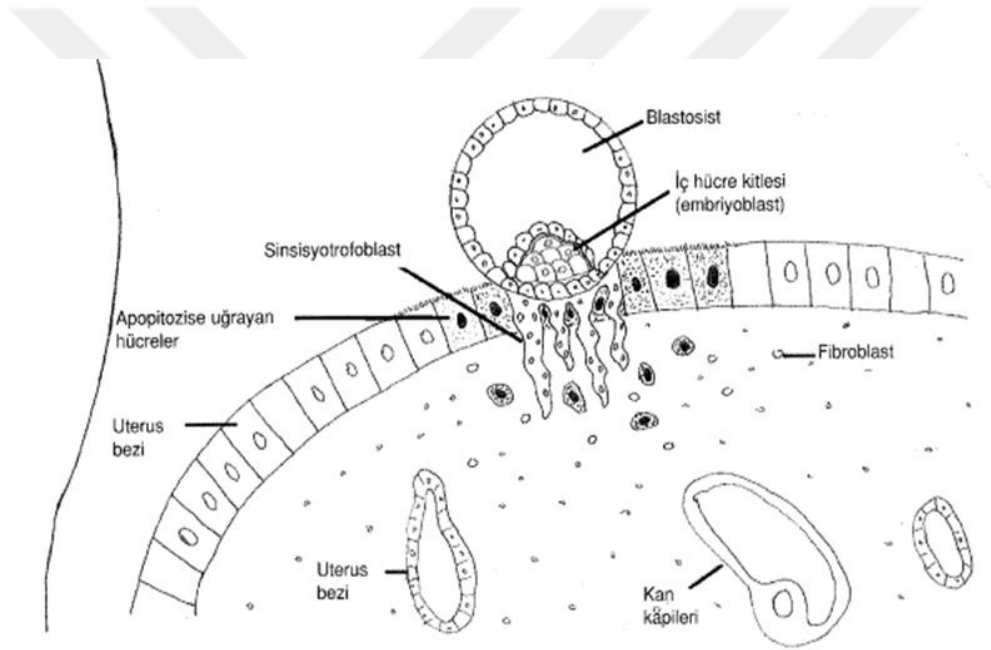
Genellikle kemiricilerde (rodentlerde) gözlenen yer değiştirerek penetrasyonda; trofoblast uterus epitelini ortadan kaldırarak onun yerine geçer. Önce blastosist uterus epitelinin apikal plazma membranına tutunur. Sonra bu hücreler dejenere olur, bazal laminadan ayrılır.

### 2.4.3.2. Kaynaşarak Penetrasyon

Genellikle tavşanlarda gözlenen, sinsisyum aracılığıyla uterus duvarının kaynaşması sonucunda gerçekleşen penetrasyon tipidir.

### 2.4.3.3. Zorla Penetrasyon

Genellikle insanlarda gözlenen, uterus epitel hücreleriyle sinsisyum uzantılarının bağlantılar yaparak hücreler arası aralıklara girmesi ve bu aralıkları doldurması sonucunda oluşan penetrasyon tipidir. Trofoblast ve uterus epiteli arasında yeni bağlantı kompleksleri oluşması sonucunda bazal laminanın ortadan kalkmasıyla trofoblast, endometriyumun lamina propriyasına nüfuz eder (Demir, 1995).



Şekil 1. İmplantasyon. Gürsoy ve Ergin (2007)'den modifiye edilmiştir.

## 2.5. İmplantasyonda Desidualizasyon

Embriyonun implantasyonu ve plasentanın gelişimi için endometriyal stromal kompartmanın geçirmiş olduğu farklılaşma sürecine 'desidualizasyon' denir. Desidualizasyonun gerçekleştiği stromal kompartmanda endometriyal stromal hücreler desidual hücrelere farklılaşır. Spiral arterlerde genişleme ve anjiyogenezis gerçekleşir. Endometriyal bezlerde sekresyon fazına geçer ve artan sitokinlerin etkisiyle monosit ve

uterus doğal öldürücü hücrelerinin ortama göçü gerçekleşir (Gellersen ve Brosens, 2003). 28 günlük menstruel siklus sürecinin 23. gününde endometriyal stromal hücreler morfolojik ve biyokimyasal farklılaşmalar geçirerek bunun sonucunda desidual hücrelere dönüşür. Başta progesteron olmak üzere relaksin, cAMP (siklik adenozin monofosfat), gonadotropinler, prostaglandin ve çeşitli büyüme faktörleri endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonunu indüklemektedir (Kasahara ve ark, 2001).

İmplantasyon döneminde desidua hücrelerinde laminin, Tip IV kolajen, fibronektin, heparan sülfat ve proteoglikan sentezlenir (Gürsoy ve ark, 2009). Endometriyal stromal hücrelerin farklılaşması, ilk olarak implantasyon bölgesindeki stromal hücrelerde başlar ve ardından tüm endometriyuma yayılır. Desidual hücre sayısının artması sonucunda, desidualizasyon bölgesi üç farklı tabakalanma gösterir. Embriyonun implantasyonunun gerçekleştiği ve plasentanın altında yer alan endometriyuma 'desidua bazalis' adı verilir. Embriyonun üzerini kaplayan endometriyum bölgesine 'desidua kapsülaris' adı verilirken implantasyon alanının dışında kalan miyometriyumun iç yüzeyini döşeyen endometriyum bölgesine ise 'desidua pariyetalis' adı verilir (Sadler, 2011). Desidual dokunun görevi, özellikle implantasyon ve erken gebelik süreçlerinde trofoblast hücreleri ve miyometriyum arasında immünolojik bir bariyer oluşturarak inflamatuvar sinyallere ve oksidatif strese karşı embriyoyu korumaktır (Gellersen ve ark, 2010).

## **2.6. Kalsitonin Hormonu ve İmplantasyondaki Yeri**

Kalsitonin hormonu parafoliküler hücrelerden tirokalsitonin şeklinde sentezlenerek kapillerlere salınan 32 aminoasitli, protein yapısında bir hormondur. Parafoliküler hücrelerin kalsitonin üretimi ve salınımı hipofiz hormonlarından bağımsız olup, doğrudan kan kalsiyum seviyesiyle ilişkilidir. Tiroitten salgılanan kalsitoninin esas görevi kan serumundaki kalsiyum seviyesini düşürmektir. Bu olay öncelikle kemiklerdeki osteoklastların sayısını azaltmak ve aktivitelerini indirgemekle gerçekleştirilir. Böylelikle kemiğin rezorpsiyonu ve kalsiyumun açığa çıkışı azalır. Kalsitonin aynı zamanda böbreklerden idrara kalsiyum ve fosfor iyonlarının atılımını artırır (Kierszenbaum ve Tres, 2012).

Yapılan çalışmalar sonucunda, sıçan ve insan endometriyal epitelinde menstruel siklusun implantasyon penceresi süresince geçici olarak kalsitoninin eksprese edildiğini ve

bu ekspresyonunun özellikle glandular epitelde progesteron tarafından düzenlendiğini göstermiştir (Kumar ve ark, 1998). Kalsitoninle yapılan çalışmalar sonucunda kalsitoninin implantasyon süresince uterusu otokrin ve parakrin etki gösterdiğini ispatlamıştır (Li ve ark, 2002). Sıçan plasentasındaki desidua ve trofoblastlarda CGRP (kalsitonin gen ilişkili peptid) reseptörlerinin varlığı, CGRP'nin implantasyon bölgesinde otokrin veya parakrin yolla çalıştığını desteklemiştir (Dong ve ark, 2002).

## **2.7. Bazal Membran Bileşenleri**

Vücutta epitel ve endotel hücrelerinin bazolateral kısmında bulunan düz kas, iskelet kası, sinir hücreleri, kalp kası ve yağ hücrelerinin etrafını kaplayan, ilişkili olduğu diğer hücreleri etrafındaki bağ dokusundan ayıran çok ince ve devamlı yapı 'bazal membran' olarak isimlendirilir (Akay, 2010). Tip IV kollajen, laminin, nidojen/entaktin ve perlekandan oluşan bazal membran bileşenleri; hücre davranışı ve sinyal yollarını düzenler (Hallmann ve ark, 2005).

### **2.7.1 Laminin**

Laminin; tek polipeptid zincirinden oluşan glikoprotein heterodimeridir. Zincir uzun kol boyunca birbirine sarılmış 3 tane kısa alana sahiptir. Farklı laminin genlerinde her zincir için bir kod bulunurken alandaki yapılar aynı homolojiyi paylaşmaktadır (Inagaki ve ark, 2005). Embriyonik gelişim sırasında ve plasenta oluşumunda rol oynamaktadır. İnsan embriyolarındaki laminin 1'in, tip IV kollajenaz ekspresyonunu artırdığı ve maternal matrikste trofoblast adezyonunu kolaylaştırdığı düşünülür. Bazal laminanın yapısında önemli rol oynayan laminin, Tip IV kollajene bağlanır. Laminini kodlayan geninde mutasyon olan farelerde bazal lamina oluşmaz. Bunun sonucunda embriyogenez sırasında fareler ölür (Akay, 2010).

## **2.8. Adezyon Molekülleri**

Hücre yüzeyinde yapısal olarak bulunan, bazı uyarılar sonucunda hücre yüzeyinde ortaya çıkan, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde rol alan moleküllerdir. Korunma, hücre içi veya hücreler arası sinyal iletiminin düzenlenmesi, hücre iskeleti aracılığıyla hücre hareketinin organizasyonu, yara iyileşmesi, doku bütünlüğünün sağlanmasında görevlidirler. Hücrelerin çoğalması ve migrasyonu, endotel ve epitel hücrelerinin seçici bir

bariyer oluşturması, hücrelerin birbirlerine ve matrikse bağlanması adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Adezyon molekülleri ve ekstrasellüler matriks (ECM) arasındaki ilişkilerin; hücre aktivasyonu, proliferasyonu, tümör oluşumu ve apoptozda önemli olduğu belirtilmiştir. Yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre; reseptör protein tirozin fosfatazlar, immünoglobulin süper ailesi, kaderinler, integrinler, selektinler ve hyaluronat reseptörler olmak üzere altı grup altında incelenebilir (Ergüler ve ark, 2002).

### 2.8.1. $\alpha V\beta 3$ İntegrin

Endotel hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblast, makrofajlar ve mezenkimden köken alan hücrelerin neredeyse tümünden eksprese edilen çok yaygın integrinlerden birisidir (Kokubo, 2007).

Endometriyumun luminal epitelinde en iyi karakterize edilen hücre adezyon molekülü olup, tavşan modellerinde  $\alpha V\beta 3$  integrinin blokajı implantasyonu bozar (Illera ve ark, 2003). İmplantasyon penceresi sırasında uterusun luminal ve glandular epitelinde eksprese edilmektedir. Farede yapılan çalışmalarda  $\alpha V\beta 3$  integrinin blokajı sonucunda implantasyonun bozulduğu, fakat  $\alpha V$ 'siz farelerin fertil olduğu görülmüştür (Illera ve ark, 2000).

## 2.9. Kök Hücre

Farklı bir hücreye farklılaşma kapasitesi yüksek olan, hem embriyonik hem de erişkin dönemde bulunan, erişkin dönemde yıllarca suskun kalabilen fakat yaralanma, onarım durumlarında aktif hale gelebilen hücreler 'kök hücre' olarak isimlendirilir (Şahin ve ark, 2015). Kök hücrelerin özellikleri, kendini yenileme, farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği, klon oluşturma yeteneğine sahip olmalarıdır (Can, 2014).

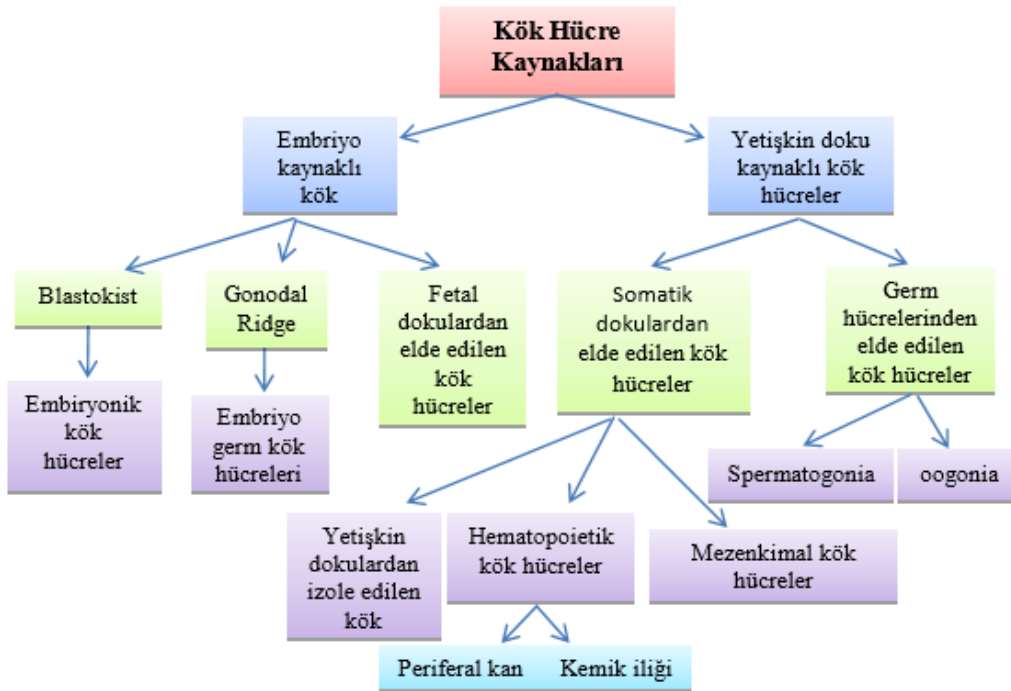
Buldukları dokuya göre kök hücreler embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Şekil 2). Farklılaşma potansiyellerine göre ise totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılır (Şahin ve ark, 2005).

Tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Pluripotent hücrelerse; vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip

olmalarına rağmen, artık tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildir (Skibber ve ark, 2001). Multipotent hücreler, birbirine yakın hücre gruplarını oluşturabilirler. Örneğin; kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilme potansiyellerine sahiptirler. Unipotent hücrelerse, kas ana hücresinde olduğu gibi sadece bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir (Bunnell ve ark, 2008).

Embriyonik kök hücreler; blastosistin dış kısmının ayrılıp, iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerin kültüre edilmesi sonucu oluşan pluripotent kök hücrelerdir. Kendini yenileme ve çoğalma özelliğine sahip olan bu hücreler, aynı zamanda pek çok hücre tipinde dönüşebilmektedir.

Erişkin kök hücreler; yetişkinlerde farklılaşmış dokularda farklılaşmamış halde bulunmakla birlikte, kendini yenileme özelliğine sahip multipotent kök hücrelerdir. İhtiyaç halinde farklılaşma göstererek doku ve organların yenilenmelerini sağlamaktadırlar (Özen ve Sancak, 2014).



Şekil 2. Kök hücrelerin sınıflandırılması. Gülşah Kürkçü (2012)'den modifiye edilmiştir.

### 2.9.1. Mezenşimal Kök Hücreler

Kemik iliği stroması içinde yer alan, erişkin tip kök hücrelerdir. Destek hücresi özelliği taşıyan fibroblast benzeri multipotent kök hücrelerdir. Ortam şartlarına bağlı olmak kaydıyla, uygun koşullarda yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilme özelliğine sahiptirler. Bunun dışında mezodermal kökenli olmayan endotel ve nöroektoderm gibi çok çeşitli hücrelere farklılaşabilirler (Cannazik ve Polat, 2014)

İlk olarak 1970 yıllarında Friedenstein ve arkadaşları tarafından tanımlanan mezenşimal kök hücrelerin, yüzeye yapışabilme özelliği vardır. Friedenstein yaptığı çalışmalarda kemik iliği aspiratını fetal buzağı serumu içeren ortama yaymıştır ve morfolojik olarak fibroblastlar benzeyen hücrelerin var olduğunu ve bu hücrelerin farklılaşabilme özelliklerine sahip olduğunu gözlemlemiştir (Friedenstein ve ark., 1976).

Mezenşimal kök hücreler, homeostazın ve doku onarımının sağlanmasında önemli rol oynayan mezenşimal kök hücreler, vücudumuzda kemik iyileşmesinde de görev alır (Hwang ve ark, 2009). Bağışıklık sistemi tarafından reddedilmezler ve donör dokudan kolay elde edilebilirler. İn vitro ortamda verimli bir şekilde üretilmesi ve farklılaştırılması için kimyasal ve fiziksel uyarılar büyük önem taşımaktadır (Meinel ve ark, 2004).

İn vitro kültür ortamında üretilen mezenşimal kök hücrelerin pasaj sayısının artması hücrelerde stres belirtilerinin ortaya çıkmasını sağlar. Pasaj sayısının artmasıyla birlikte sitogenetik bozukluk, telomer kısalması, aktin birikmesi ve tutunmanın azalması gibi durumlar görülmektedir. Bu yüzden pasaj sayısının üçü geçmemesine dikkat etmek gerekir (Matur ve Solmaz, 2011).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücre kültürü aşaması Adnan Menderes Üniversitesi (ADÜ) Merkez Araştırma Laboratuvarında, hayvan deneyleri aşaması ADÜ Hayvan Deneyleri Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Dokuların histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaları Adü Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi ADÜ Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde akım sitometri analizi yapıldı. ADÜ Veteriner Fakültesi'nde İmmunofloresans görüntüleme yapıldı.

#### 3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmamız için, ağırlıkları 180-200 gram arasında değişen, 32 adet erişkin dişi “*Wistar Albino*” cinsi ratlar kullanıldı.

##### 3.1.1. Deney Grupları

**Kontrol Grubu (K Grubu):**  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , %45-65 nem ve 14 saat aydınlık/10 saat karanlık ortamda, yem ve suyun *ad libitum* sağlandığı koşullarda 16 adet dişi sıçan takip edildi. Gebeliğin 10. günü (8 dişi) ve gebeliğin 21. günü (8 dişi) olmak üzere hayvanlar 2 farklı gruba ayrıldı. Dişi sıçanlar bir gece erkek sıçanlarla (bir dişi+bir erkek) aynı kafeste bekletildi. Ertesi sabah vaginal smearlarında spermatozoon bulunan dişi sıçanın gebeliğin 0. gününde olduğu kabul edildi. Gebeliğin 10. gününü ve 21. gününü tamamlayan sıçanlara, aynı gün içerisinde kuyruk veninden PBS (fosfat tuzu tamponu) verildi. Gebeliğin 10. gününü ve 21. gününü tamamlayan sıçanlara anestezik madde (Ketamin+Ksilezin) intraperitoneal yoldan verilerek servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek implantasyon bölgeleri çıkartıldı ve %10'luk formaldehitin içerisine konuldu.

**Kök Hücre Grubu (KH Grubu):**  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , %45- 65 nem ve 14 saat aydınlık / 10 saat karanlık ortamda, yem ve suyun *ad libitum* sağlandığı koşullarda 16 adet dişi sıçan takip edildi. Gebeliğin 10. günü (8 dişi) ve gebeliğin 21. günü (8 dişi) olmak üzere hayvanlar 2 farklı gruba ayrıldı. Dişi sıçanlar bir gece erkek sıçanlarla (bir dişi+bir erkek) aynı kafese konuldu. Ertesi sabah vaginal smearlarında spermatozoon bulunan dişi sıçanın gebeliğin 0. gününde olduğu kabul edildi. Aynı gün sıçan kemik iliğinden elde ettiğimiz

1x10<sup>6</sup> mezenşimal kök hücreler 1 ml tam besi yeri içerisinde kuyruk veninden enjekte edildi. Gebeliğin 10. gününü ve gebeliğin 21. gününü tamamlayan sıçanlara anestezi madde (Ketamin+ Ksilazin) intraperitoneal yoldan verilerek servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. İmplantasyon bölgeleri çıkartıldı ve %10'luk formaldehitin içerisine konuldu.

### **3.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenşimal Kök Hücre Elde Edilmesi:**

Mezenşimal kök hücre elde edilmesi için donör olarak 180-200 gram ağırlığındaki 6 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar ketamin (Alfamine, 10mg/ml) ve Ksilazin (Alfazyne, 20mg/ml) uygulaması ile anestezi altında sakrifiye edildi. %70'lik alkol ile arka ve ön ayakları steril edildikten sonra steril makas/bisturi ile sıçanların femurları çıkartıldı. Çıkarılan femurlar yumuşak dokularından temizlenerek kemiklerin serbest hale gelmesi sağlandı. Önceden hazırlanan 40 ml PBS içeren falkon tüplerin içine yumuşak dokusundan temizlenen femurlar konuldu. Kök hücre kültür laboratuvarına kısa sürede transfer edildi.

#### **3.2.1. Hücre Kültür İşlemleri:**

Bu işlem için, Minimum Essential Medium (MEM) çekilmiş insülin enjektörleri kullanıldı. Her kemik için 1cc, toplamda ise hayvan başına 5-7cc MEM(Minimum Eagle Medium) kullanıldı. Femurun ortasından tutularak makas yardımı ile kemiklerin her iki uç kısmından kesildi ve böylece kanal açılmış oldu. Medyumdan 5 ml çekilerek steril falkon tüplere (50 ml'lik) konuldu. Medyum konulan falkon tüpün kapağı açılarak uçları kesilen kemikler dik bir şekilde pens yardımı ile falkon tüpün içerisine doğru tutuldu. Ardından daha önceden medyum çekilen insülin enjektörlerinin iğneleri bu kemiklerin kanalından içeriye doğru sokularak medyum içeriği kanaldan içeri doğru enjekte edildi. Kemik iliği içeriği bulunan falkon tüpü 5-10 sn çalkalandı ve sonrasında 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Çıkan süpernatant atıldı ve pellet üzerine medyum ilave edilerek tekrar 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine tekrar 13 ml tam besi yeri(%15 FBS, %1Pen Strep, %84 MEM) eklenerek pipetaj yapıldı, T25 flakslara dağıtıldı. Böylece flakslara hücre ekimi yapılmış oldu. CO<sub>2</sub> inkubatorüne kaldırılan hücrelerin üç günde bir medyumunu değiştirildi ve mikroskopta kontrol edildi. Üçüncü pasajın sonunda hücreler sayım yapıldıktan sonra donduruldu.

### **3.2.1.1. Red Floresan Proteinle (RFP) Mezenşimal Kök Hücrelerin İşaretlenmesi**

Çalışmamızda; MKH'lerin immunfloresan mikroskopunda görüntülenmesi için RFP (Sigma-Aldrich PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling) kiti kullanılmıştır. Önceden dondurduğumuz  $8 \times 10^6$  mezenşimal kök hücre su banyosunda çözdürüldü. Her hücre için 5 ml olacak şekilde MEM eklendi. 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve her hücreye 5 ml olacak şekilde tekrar MEM eklendikten sonra tekrar 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. Ependorfa kitin içerisinde yer alan diluent C'den 0.8 ml ekleyip pipetaj yapıldı. Santrifüj edilen hücrelerin süpernatantı atıldı ve pellete ependorfa eklediğimiz diluent C solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı. Başka bir ependorfa diluent C den 1 ml alındı, boya solüsyonundan 4 mikrolitre eklenerek pipetaj yapıldı. Yukarıdaki karışımdan 800 mikrolitre alındı ve hücrelere eklendi. Hücrelerin üstüne 1,6 ml FBS (Fetal Boin Serum) eklenip 1 dakika bekletildi. 6 ml tam besiyeri eklendi. Sonra 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantı atıldıktan sonra 6 ml tam besiyeri eklenip tekrar santrifüj edildi. Son olarak tekrar süpernatant atıldı ve her hayvan başına 1ml içerisinde  $1 \times 10^6$  olacak şekilde toplam 8 ml tam besiyeri eklendi. Sıçanlara mezenşimal kök hücreler kuyruk veninden verildi.

### **3.2.1.2. Hücre Canlılık Testi:**

Kültür edilen hücreler tripsin ile muamele edildikten sonra petrilere ayrılarak 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet kısmına PBS ile pipetaj yapıldı. Sonra Tripkan blue ile 1/1 oranında dilüe edilerek geliştirilmiş Neubauer lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı.

### **3.2.1.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Akım Sitometrik Analizi:**

Akım sitometride mezenşimal kök hücrelerin yüzey markırlarının ekspresyonunu analiz etmek için CD 11b, CD 29, CD 45 ve CD 90 antikorları kullanıldı. Buradaki amaç süspansiyon haline gelmiş hücrelerin mezenşimal kök hücre olup olmadığının gerekli monoklonal antikorlar yardımıyla analiz etmektir. Erken dönem pasajlara ait mezenşimal kök hücre dizisi yüzey ekspresyon işaretçileri bakımından akım sitometrik analiz kullanılarak tanımlandı. Kültür kabının yüzeyine tutunmuş olan mezenşimal

hücreleri %0.25 tripsin-edta (tripsin etilendiamin tetraasetikası) ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra kültür medyumunu içeren tüplere aktarılıp santrifüj edildi. Santrifüj ve PBS'le yıkama sonrası pellet çözüldü ve hücreler sayıldıktan sonra  $1 \times 10^6$  olacak şekilde PBS içerisinde süspanse edildi. Daha sonra, belirlenen hücre yüzey işaretçilerine özel fluorescein isothiocyanate (FITC) konjuge monoklonal CD 11b, CD 29, CD 45 ve CD 90 antikoları % 3 BSA içeren PBS içerisinde ( $1 \mu\text{g/ml}$  olacak şekilde) oda ısısında, karanlıkta, 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası %0.1 sodyum azide içeren yıkama solusyonu eklendi ve 5 dakika 1300 rpm'de santrifüj edilerek temizlendi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur Akım Sitometri (BD Sciences) cihazında okutuldu ve analizi BD Cell Quest™ software programı ile yapıldı.

Ayrıca doku düzeyinde inceleme için 21 günlük kök hücre grubuna ait akciğer örneklerinde akım sitometrisi yöntemiyle Cd 34 sayımı yapıldı. Örnekler neşterle küçük parçalara ayrıldı. Örneğin üstünü kapatacak şekilde, isoflow tampon çözeltisi konuldu. Sonra örnek parçalıyıcıda 1 dk boyunca parçalandı ve örnekleme kabına konuldu. Son olarak Navios Beckman Coulter cihazında incelendi.

### 3.3. İmmunofloresan İnceleme

21 günlük kök hücre verilmiş gebe sıçanlardan alınan implantasyon bölgesine ait doku örnekleri tespit edildikten sonra parafine gömülüp örnekler,  $5 \mu\text{m}$ 'lik kesitler oluşturacak şekilde lam üzerine alındı. Sonra ksilolde deparafine edildi ve alkol serilerinden geçirildi. PBS ile yıkandı. 10 dakika Metanol ile karanlık ortamda bekletildi ve PBS ile 3 kez yıkandı. Sonra PBS içerisinde 1/1000 oranında dilue edilen DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) boyasında 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkandı. Lam üzerine mounting medyum damlatılarak lamel ile kapatıldı ve dokular floresan mikroskopta görüntülendi.

Ayrıca 21 günlük kök hücre verilmiş gebe sıçanlardan alınan implantasyon bölgesine ait doku örnekleri OCT (Optimal Cutting Temperature) bileşenine gömülü halde  $+4^\circ\text{C}$ 'de 1 gece bekletildikten sonra frozen (Cryostat A650) da  $5 \mu\text{m}$ 'lik kesitler lam üzerine alındı. 10 dakika Metanol ile karanlık ortamda bekletildi ve PBS ile 3 kez yıkandı. Sonra PBS içerisinde 1/1000 oranında dilue edilen DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole)

boyasında 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkandı. Lam üzerine mounting medyum damlatılarak lamel ile kapatıldı ve dokular floresan mikroskopta görüntüledi.

### **3.4. Dokuların Elde Edilmesi**

Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 25.02.2016 tarih ve 64583101/2016/58 sayılı onay alınarak yapılmıştır. Çalışma için, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel laboratuvarında çiftleştirilen ve gebeliği belirlenen “*Wistar albino*” cinsi dişi sıçanlara ait embriyonun implante olduğu bölgeleri ve plasentaları alındı. Dokular serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra %10'luk nötral formaldehitin içine alınıp 16 saat bekletilerek tespit işlemi yapıldı.

### **3.5. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Takibi**

%10'luk nötral formaldehitte 16 saat tespit edilen dokular 12 saat akarsu altında yıkandı ve bunun sonucunda formalin solüsyonundan arındırıldı. Daha sonra dokular, doku takip cihazında sırasıyla, %100, %90, %80, %80, %70 ve %70'lik alkollerde 12 saat bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Şeffaflaştırma ve alkolü dokudan uzaklaştırmak için 2x15 dakika ksilolde bekletilen dokular, 1/1 hacimde parafin/ksilol içerisinde 1 saat bekletildikten sonra, saf parafin içine alınıp 4 saat daha bekletildi. İnfiltrasyon işleminin ardından parafin bloklara gömme işlemi gerçekleştirildi. Her bir parafin bloktan, tam otomatik, rotary mikrotom (Leica RM 2265, Germany) yardımıyla Feather mikrotom bıçağı (35S) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlere hematoksilin-eozin ile histokimyasal boyama (H-E), laminin, kalsitonin ve  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin antikoları kullanarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. Olympus - BX50 mikroskobu ile görüntüleri alındı.

#### **3.5.1. Hematoksilin-Eozin Boyama Protokolü**

- 1) Parafin kesitler ksilolde deparafinize edildi. Azalan alkol derecelerinden 2 dakika süreyle geçirilip distile suya kadar getirildi ve distile suda 5 dakika bekletildi.
- 2) Filtre edilmiş Mayer's Hematoksilin (Merck %37) solüsyonunda 2 dakika bekletildi.

- 3) Kesitler 5 dakika distile suda bekletilerek, hematoksilin artıklarından arındırıldı.
- 4) Zıt boyama için Eozin-Y (HT110132 Sigma) solusyonunda 2 dakika bekletildi.
- 5) Dehidratasyon ve parlatma için 2'şer dakika yükselen alkol derecelerinde sırasıyla %80, %90 ve %100 etil alkol serilerinden geçirildi.
- 6) Ksilolden geçirilerek, Entellan-Nuevo (Merck Millipore) damlatıldı ve lam ile kapatıldı.

### **3.6. İmmunohistokimyasal İnceleme**

İmmunohistokimyasal incelemeler, Hsu ve ark. (1981) tarafından açıklanan metoda göre yapılmıştır. İnceleme için uterus ve plasenta dokusundan 5 µm kalınlığında kesitler feather mikrotom bıçağı (35S) kullanılarak alındı. Alınan kesitlerdeki dokulara sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

- 1) Uterus kesitleri immünohistokimyasal boyama için 1 gece 37°C etüvde tutuldu.
- 2) Ardından sırasıyla 59°C'de etüv içerisinde 15 dakika Ksilol içerisinde, 15 dakika ksilol dışında, 15 dk ksilol içinde, 15 dk ksilol dışına konularak şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi.
- 3) Dokuların etrafı Liquid Bloker Super PAP Pen (Sigma-Aldrich) kalemiyle çizildi.
- 4) Absolü ve %80'lik dereceli alkol serilerinde 15 dakika bekletildi.
- 5) Distile su ile yıkandı.
- 6) Tripsin- EDTA Solusyonu (Sigma-Aldrich) ile 20 dakika bekletildi.
- 7) Endojen peroksidazı maskelemek için kesitler %30'luk Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) + Metanol (LİChrosolv) 1:9 oranında (1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 9ml Metanol) 20 dk bekletildi.
- 8) Dokular 2 kez distile suyla yıkandı.
- 9) Serum Blocking Solution (İnvitrogen-Histostain- Plus Bulk Kit) damlatıldı 20 dk bekletildi.

10) 1/100 oranında dilüe edilmiş primer antikorlar (Laminin, Kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  İntegrin) sırasıyla bir saat inkübasyona bırakıldı.

11) 2 kez PBS ile yıkandı.

12) Super enhancer (İnvitrogen-Histostain- Plus Bulk Kit) sekonder antikorunda 20 dakika bekletildi.

13) 2 kez PBS ile yıkandı.

14) SS Label (İnvitrogen-Histostain- Plus Bulk Kit) 20 dakika bekletildi.

15) DAB Kromojen +  $H_2O_2$  + Buffer kromojen (İnvitrogen-Histostain- Plus Bulk Kit) 1ml içerisine 1'er damla damlatılarak iyice karıştırıldı ve 2-3 dakika bekletildi. Ardından 1 ml içerisine DAB Enhancer 1 damla damlatılarak iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi.

16) 2 kez distile su ile yıkandı.

17) 2 dakika boyunca Mayer's Hematoksilen (Merck %37) ile zıt boyama yapıldı.

18) 2 kez distile suyla yıkandı.

19) %80'lik ve %100'lük dereceli alkol serilerinde ikişer dakika boyunca bekletildi.

20) Ksilolde 10 dakika bekletildi.

21) Entellan-Nuevo (Merck Millipore) kapama maddesi ile kapatıldı.

İmmunohistokimyasal tekniklerle boyanan kesitler ışık mikroskopunda (Olympus CX31- Japan) değerlendirildi. Tüm gruplarda laminin, kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrin immün boyanması pozitif olan hücre sayılarının değerlendirilmesi HSCORE (Histolojik Skorum) ile yapıldı. İmmunohistokimyasal analizde, tüm gruplar için rastgele üçer kesit seçildi. Her bir kesitte beş bölge immunohistokimyasal boyanmanın analizi için değerlendirildi. Tüm gruplarda pozitif hücrelerin boyanma şiddetleri aşağıda verilen değerlendirmelere dahil edildi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Laminin, kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrinin kontrol ve kök hücre gruplarında şiddet ekspresyonunun skorlanması

Şiddeti	Yorumu
- (0)	Negatif
+ (1)	Zayıf
++ (2)	Orta
+++ (3)	Kuvvetli

**Tablo 2.** Laminin, kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrinin kontrol ve kök hücre gruplarında yoğunluk ekspresyonlarının skorlanması

Yoğunluğu	Yorumu
0,1	< % 25
0,4	< % 26-50
0,6	< % 51-75
0,9	<% 76-100

İmmunreaktif skor: pozitif boyanan hücrelerin şiddetinin derecesi ile boyanma yoğunluklarından elde edilen skorların birbiriyle çarpılması sonucunda yukarıdaki immunreaktif skor elde edilmiştir (Ayyıldız ve ark, 2004). Tüm gruptaki HSCORE ölçümü üç bağımsız gözlemci tarafından değerlendirilerek yapılmıştır.

### 3.7. İstatiksel Analiz

Çalışmada yer alan 10. ve 21. gün laminin, kalsitonin ve integrinin ölçümleri ortalama  $\pm$  standart sapma (ort $\pm$ s) ve ortanca (min-maks: minimum-maksimum) ile ifade edilmiştir.

Kontrol ve deney grubu, beş farklı hücre bölgesi için bu ölçümler bakımından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçlarında p değeri verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılmıştır.

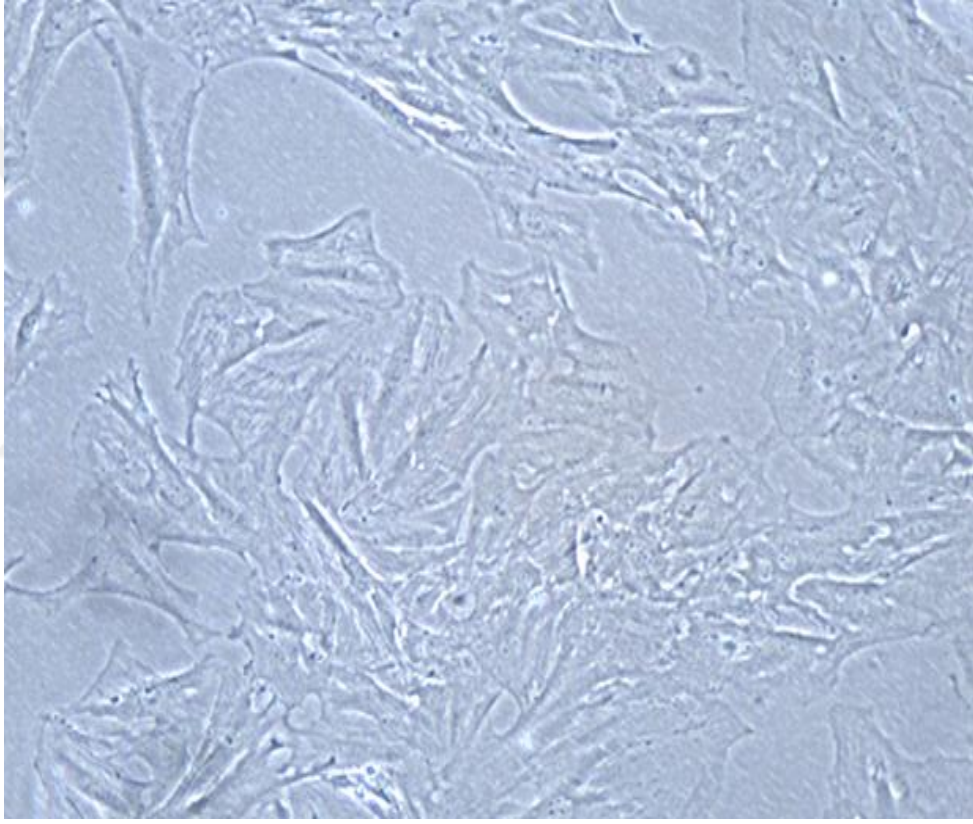


## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Kültürü ve İmmünofenotiplendirilmesi

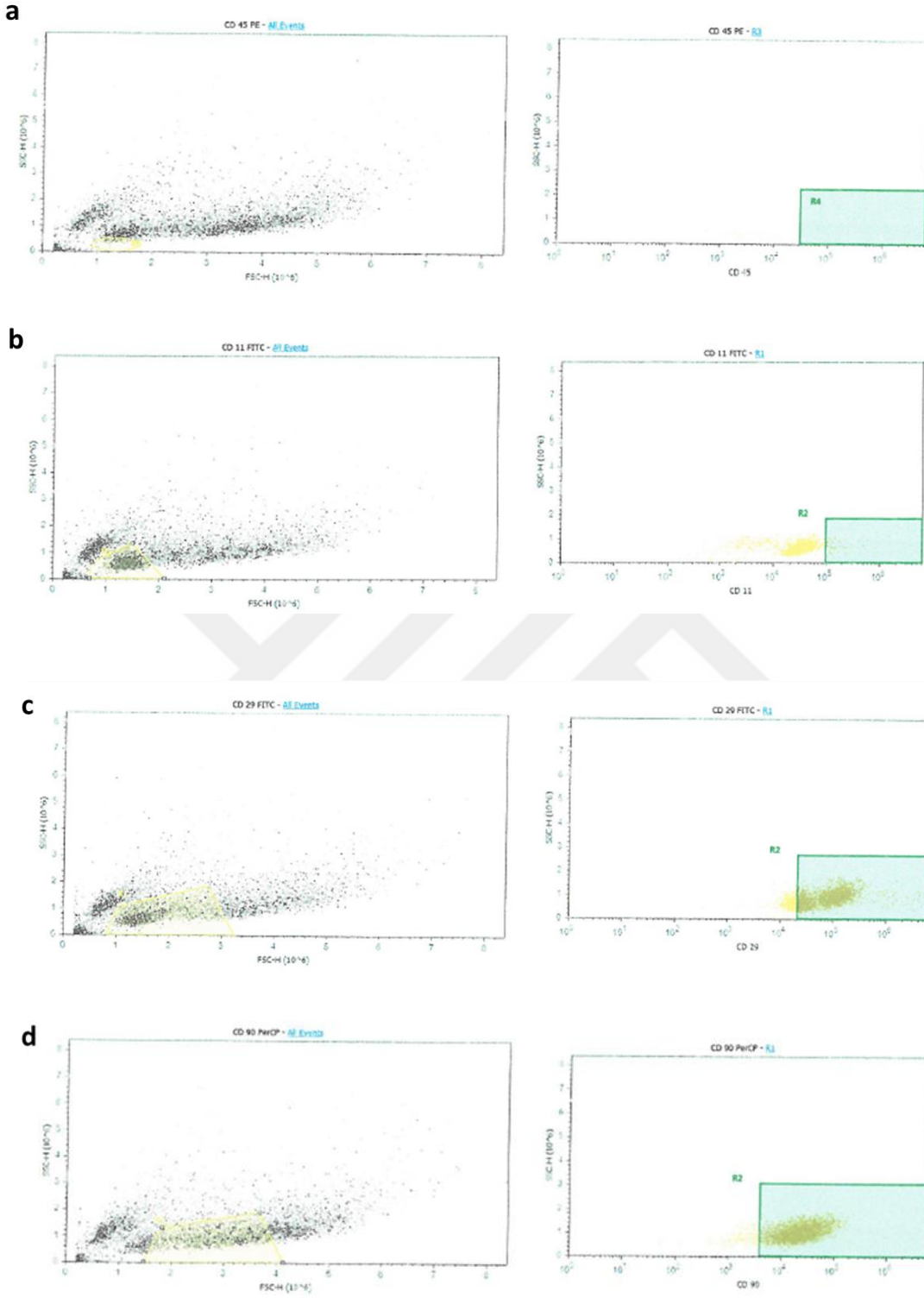
#### 4.1.1. Sıçan kemik iliğinden izole edilmiş mezenşimal kök hücrenin kültür ve immünofenotiplendirilmesi

Sıçan kemik iliğinden elde edilen ve üçüncü pasajına getirilen mezenşimal kök hücrelerin morfolojik yapısı ışık mikroskopunda gözlenmiştir (Resim 1).



**Resim 1.** Sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenşimal kök hücrelerin ışık mikroskopundaki 3. pasajdaki görüntüsü.

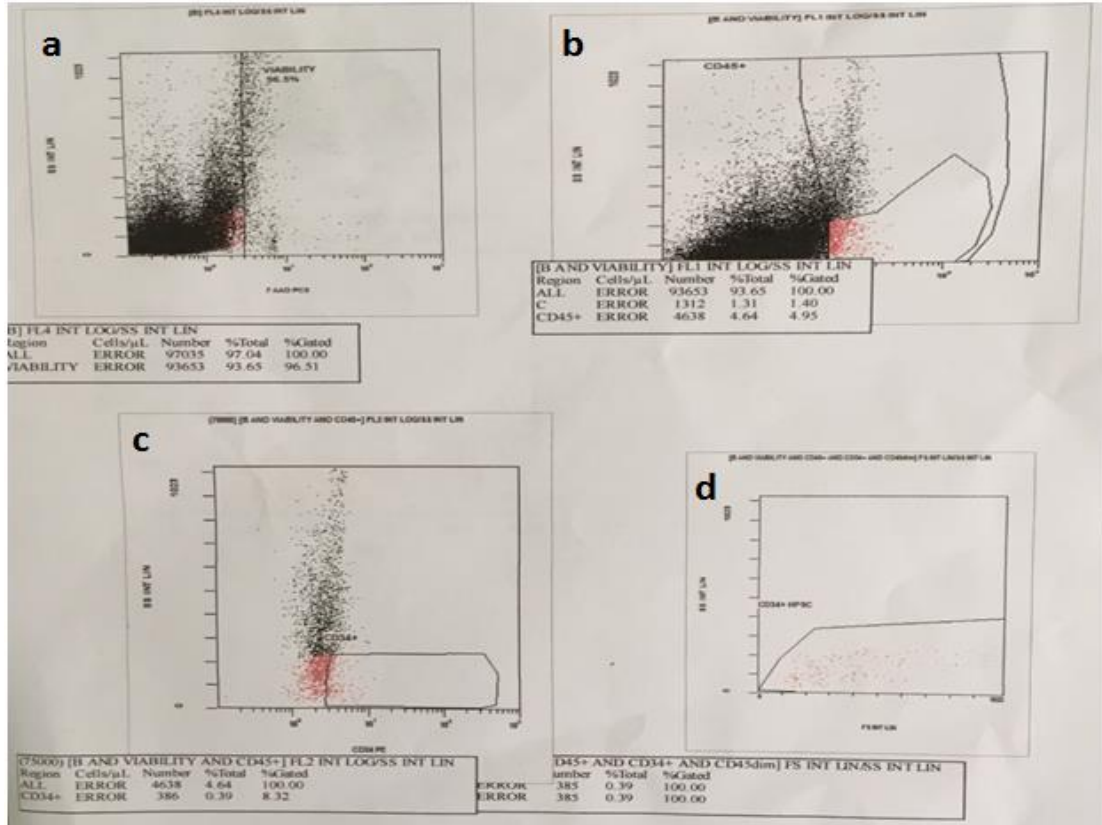
Akım sitometrisi yöntemiyle kök hücre belirteçlerini kullanarak, elde ettiğimiz hücrenin mezenşimal kök hücre olduğu kanıtlandı.



**Şekil 3.** Sıçan kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin immünofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. Sıçan kemik iliğinden elde ettiğimiz mezenşimal kök hücrelerin immünofenotipik karakterizasyonu için akım sitometrisi tekniği ile hematopoetik belirteçleri Şekil 8a:CD45 PE (% 6,87) ve Şekil 8b: CD11b FITC (% 2,43) negatif ekspresyon gösterdiği tespit edilirken, stromal belirteçleri Şekil 8c: CD29 FITC (% 78,18) ve Şekil 8d: CD90 (% 92,87) pozitif ekspresyon gösterdi.

#### 4.1.2. Akım Sitometrisi Yöntemiyle CD 34 Sayımı

Akım sitometrisi yöntemiyle doku düzeyinde yaptığımız hematopoetik kök hücre belirteçlerinden CD34 negatif çıkmıştır. Elde ettiğimiz hücrelerin mezenşimal kök hücre olduğu kanıtlandı.



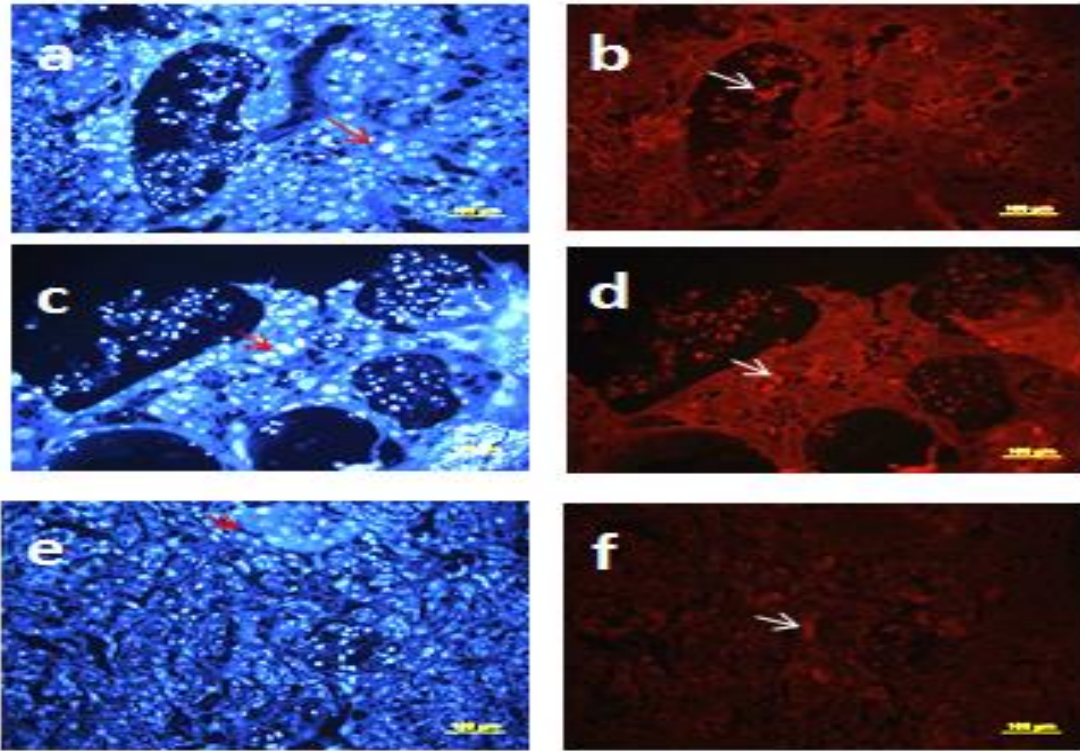
**Şekil 4.** Mezenşimal kök hücre verilmiş akciğer dokusundaki CD 34 sayımı. Şekil 4a; hücrelerin büyüklüğüne göre saçılıma bakıldı (%96.5 oranında canlı CD34 hücresi var). Şekil 4b; mezenşimal kök hücre belirteçlerinden CD45 oranına bakıldı(%4.64). Şekil 4c; CD34 hücrelerinin büyüklüğüne bakıldı(%0.39). Şekil 4d; Totalde olan CD34 hücre sayısına bakıldı ve negatif çıktı(%0.39).

#### 4.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Varlığının RFP pozitifliği ile ölçülmesi

21 günlük kök hücre grubuna ait hayvanlardan alınan ve parafine gömülerek saklanan doku örneklerinden alınan kesitler (daha öncesinde hayvanlara verilen mezenşimal kök hücrelere transplantasyondan önce RFP geni aktarılmıştır) ksilol ile deparafinize edilip alkol serilerinde bekletilmiştir. RFP ile işaretli mezenşimal kök

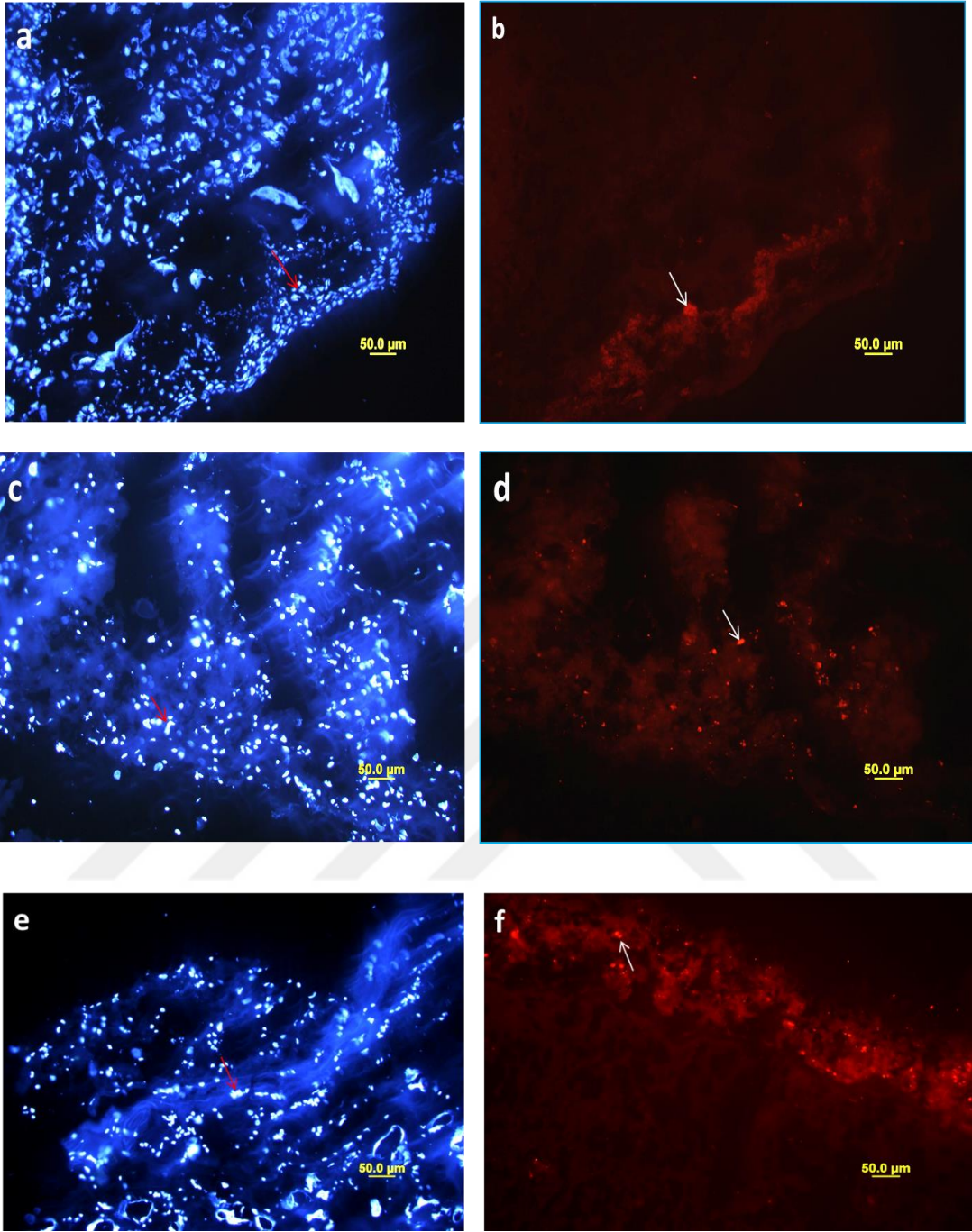
hücrelerin doku takibi işlemi floresan mikroskopta görüntülenmiştir. İnceleme öncesinde doku kesitleri metanolde fikse edildikten sonra çekirdek boyası olan DAPI ile boyanmıştır Daha sonra DAPI ve RFP için ayrı filtreler kullanılmıştır. Son olarak floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) görüntülenmiştir (Resim 2 ).

Ayrıca 21 günlük kök hücre grubuna ait örnekler +4°C’de 1 gece bekletildikten sonra frozen (Cryostat A650) da 5 µm’lik kesitler lam üzerine alındı ( daha öncesinde hayvanlara verilen mezenşimal kök hücrelere transplantasyondan önce RFP geni aktarılmıştır). 10 dakika Metanol ile karanlık ortamda bekletildi ve PBS ile 3 kez yıkandı. Sonra PBS içerisinde 1/1000 oranında dilue edilen DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) boyasında 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkandı. Lam üzerine mounting medyum damlatılarak lamel ile kapatıldı ve dokular floresan mikroskopta görüntülendi(Resim 3).



**Resim 2.** 21 günlük sıçan uterusunun parafine gömülmüş kesitine ait implantasyon bölgesinde kök hücre varlığının immünofloresan mikroskopla görüntülenmesi.

Resim a. 20X, Resim c. 20X, Resim e. 40X: Çekirdekleri DAPI ile işaretlenen hücreler kırmızı okla ifade edilmiştir. Resim b. 20X, Resim d. 20X, Resim f. 40X: RFP pozitif hücreler beyaz okla ifade edilmiştir.

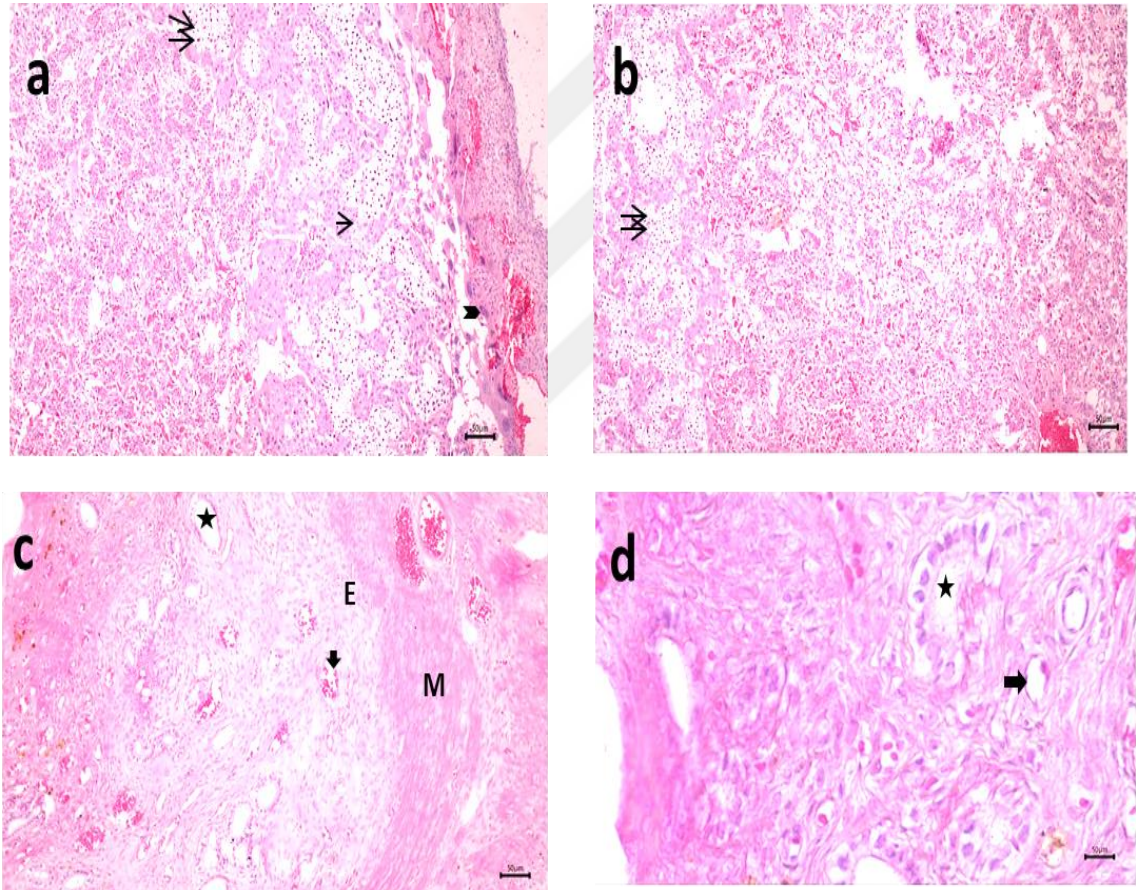


**Resim 3.** 21 günlük sıçan uterusunun frozen kesitine ait implantasyon bölgesinde kök hücre varlığının immünofloresan mikroskopuyla görüntülenmesi.

Resim a. 20X, Resim c. 20X, Resim e. 20X: Çekirdekleri DAPI ile işaretlenen hücreler kırmızı okla ifade edilmiştir. Resim b. 20X, Resim d. 20X, Resim f. 20X: RFP pozitif hücreler beyaz okla ifade edilmiştir.

#### 4.3. 10 Günlük Hematoksilen-Eozin Histokimyasal Bulguları

10 günlük gebe sıçanlarda uterus; antimezometrial ve mezometrial bölge olmak üzere 2 bölgeden oluşur. Antimezometrial bölgede desidual hücrelere göre daha küçük olan stromal hücreler yoğun bir şekilde görüldü. Lümen kısmında tek katlı prizmatik epitel hücreleri ve endometriyumda yoğun olarak boyanmış trofoblastik dev hücreler görüldü. Endometriyum ve lümen arasındaki kısım desidual alan olarak isimlendirilirken, desidual alan içinde trofoblastik dev hücreler ve stromal hücreler görüldü. Mezometrial bölgede maternal kan damarları genişler ve artar, stromal hücreler glikojence zengin hücrelere farklılaşır.



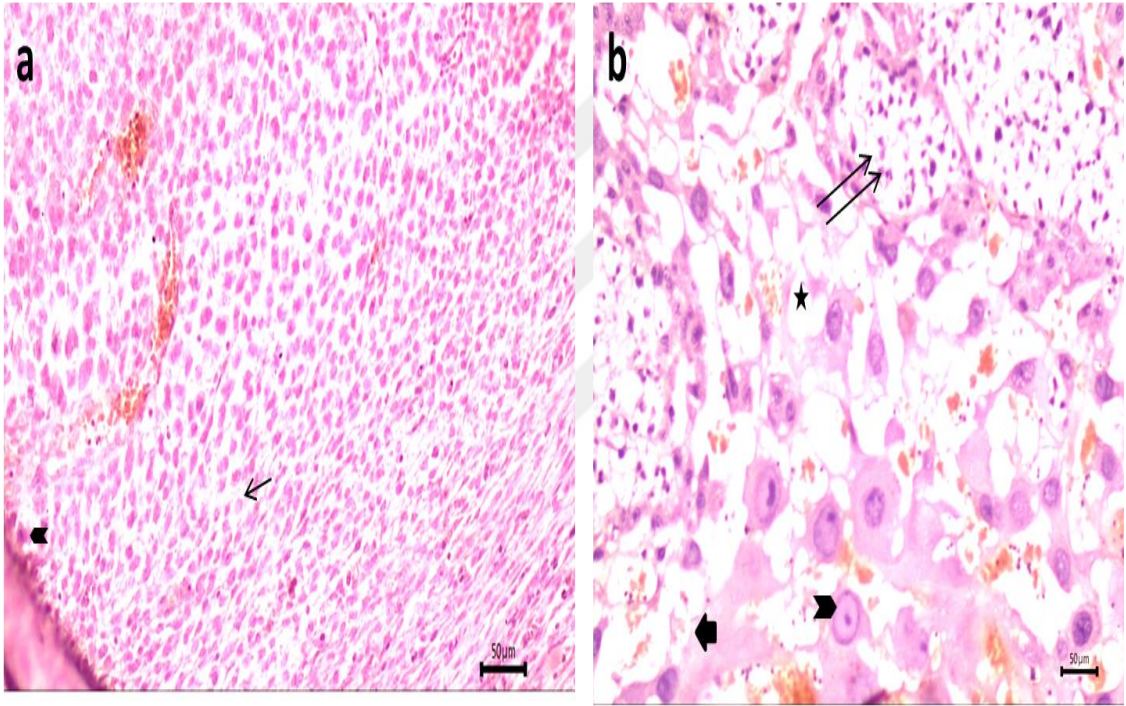
**Resim 4.** 10 günlük hematoksilen-eozin bulguları.

a: 10 günlük kontrol grubu desidual hücreler (çift ok), trofoblastik dev hücre (ok başı), stromal hücre (uzun ince ok) X4 H-E. b: desidual hücreler (çift ok) X4 H-E. 10 günlük kök hücre grubu c:bez epiteli (yıldız), damar duvarı (kalın ok), endometriyum (E), miyometriyum (M) X10 H-E. d: bez epiteli (yıldız), damar duvarı (kalın ok) X40 H-E.

#### 4.4. 10 Günlük İmmünohistokimyasal Bulgular

##### 4.4.1. Laminin 10 günlük kontrol grubu bulguları:

Kontrol grubunda gebeliğin 10. gününde laminin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular sonucunda, endometriyum ve lümen arasındaki kalan bölge desidual alanı oluşturuyor. Desidual alanda trofoblastik dev hücreler görüldü. Trofoblastik dev hücreler, stromal hücreler, damar duvarı, desidual hücreler ve bez epiteli orta şiddette immünreaktivite gösterdi.

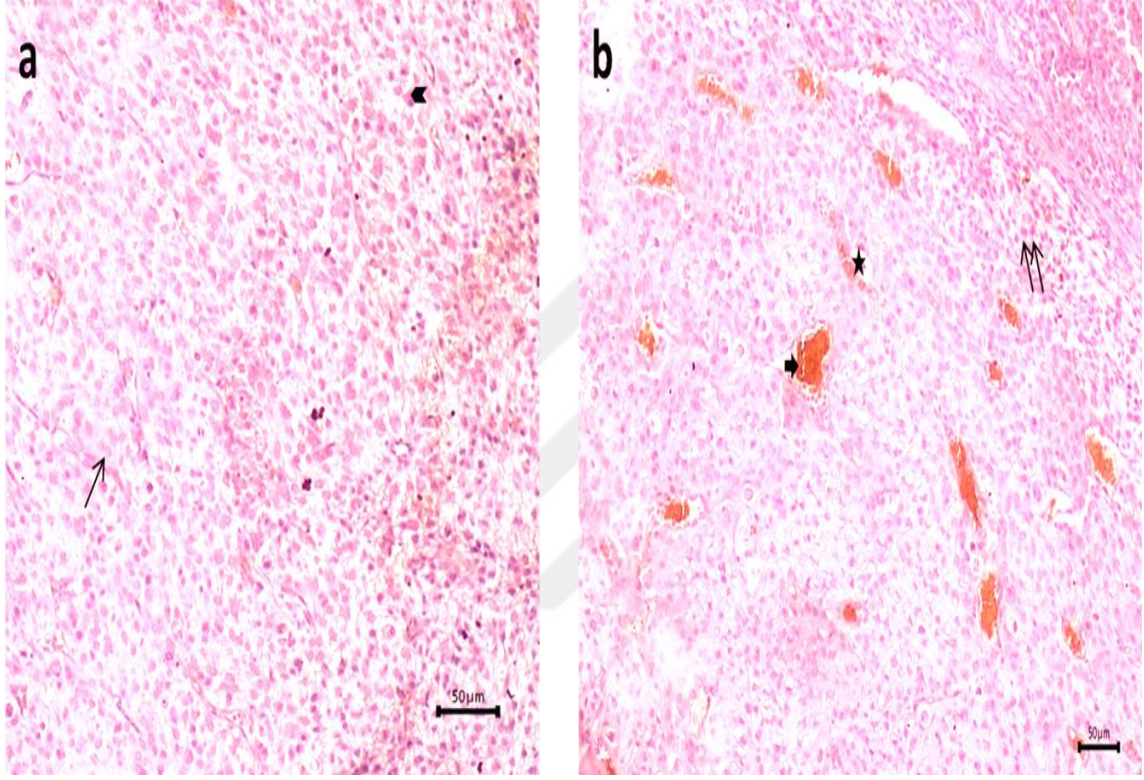


**Resim 5.** 10 günlük kontrol grubu uterusuna ait laminin immunohistokimyasal boyamaları.

a: Trofoblastik dev hücre (ok başı), stromal hücre (uzun ince ok) X10. b: desidual hücre (çift ok), kan damarı (kalın ok), bez epiteli (yıldız), trofoblastik dev hücre (ok başı) X10.

#### 4.4.2. Laminin 10 günlük kök hücre grubu bulguları:

Kök hücre grubunda gebeliğin 10. gününde laminin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; Trofoblastik dev hücreler, stromal hücreler, desidual hücreler, damar duvarı ve bez epiteli orta şiddette immünreaktivite gösterdi.

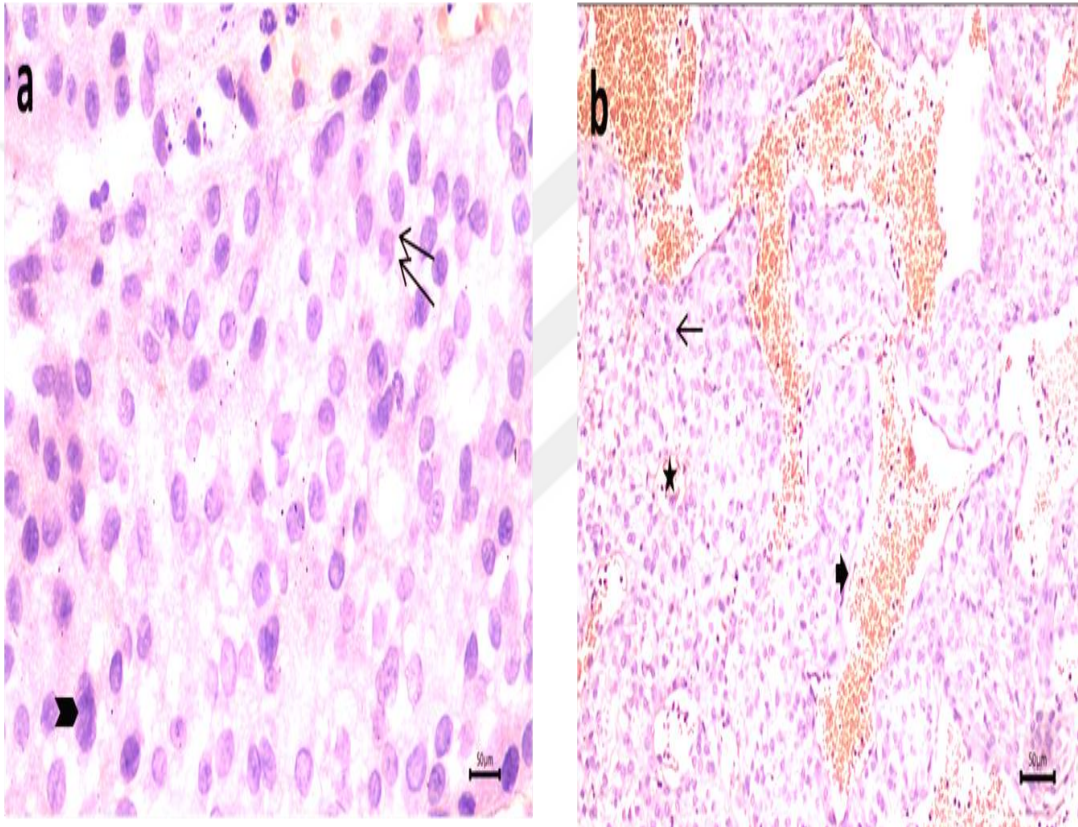


**Resim 6.** 10 günlük kök grubu uterusuna ait laminin immunohistokimyasal boyamaları.

a: stromal hücre (uzun ince ok), trofoblastik hücre (ok başı) X10. b: bez epiteli (yıldız), desidual hücre (çift ok), damar duvarı (kalın ok) X10.

#### 4.4.3. Kalsitonin 10 günlük kontrol grubu bulguları

Kontrol grubunda gebeliğin 10. gününde kalsitonin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; endometriyum ve lümen arasındaki kalan bölge desidual alanı oluşturuyor. Desidual alanda trofoblastik dev hücreler görüldü. Trofoblastik dev hücreler, damar duvarı, desidual hücreler ve bez epiteli orta şiddette boyandı. Stromal hücreler zayıf immünreaktivite gösterdi.

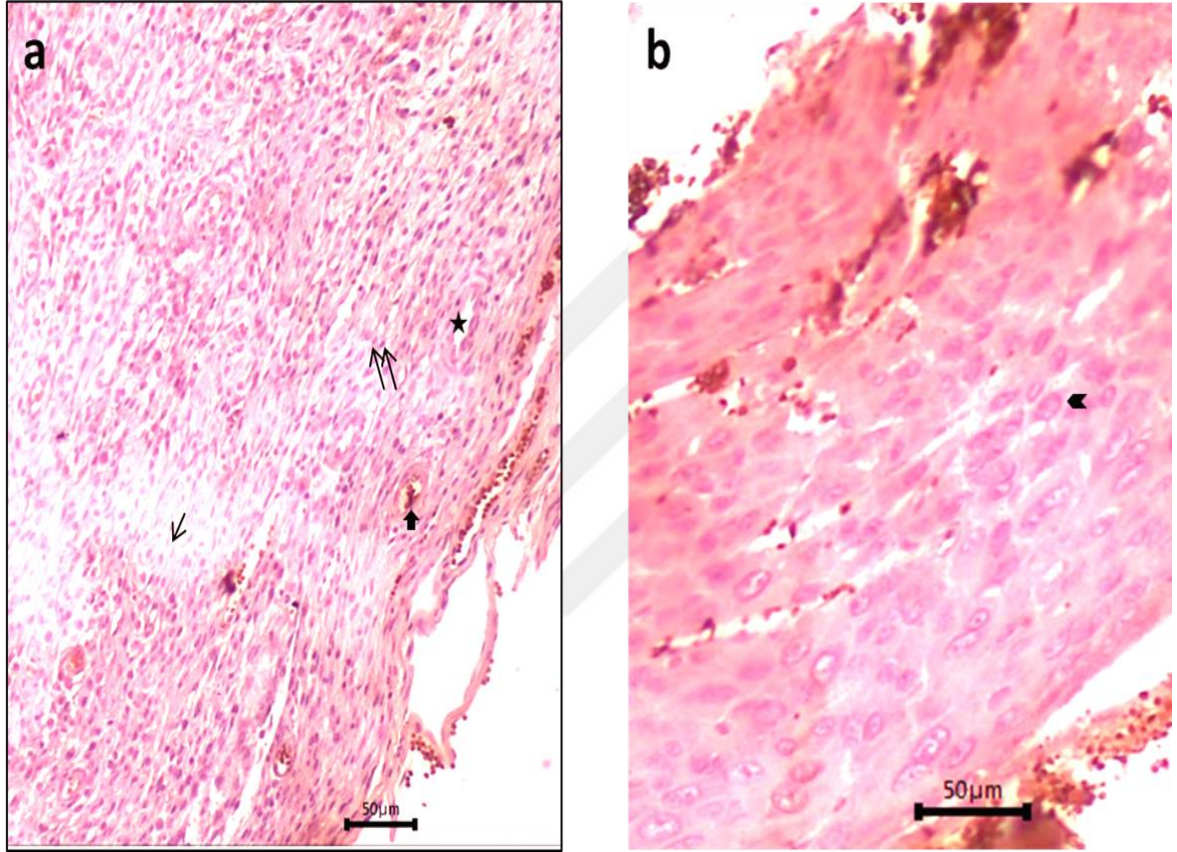


**Resim 7.** 10 günlük kontrol grubu uterusuna ait kalsitonin immunohistokimyasal boyamaları.

a: trofoblastik dev hücre (ok başı), desidual hücre (çift ok) X40. b: bez epiteli (yıldız), damar duvarı (kalın ok), stromal hücre (uzun ince ok) X10.

#### 4.4.4. Kalsitonin 10 günlük kök hücre grubu bulguları

Kök hücre grubunda gebeliğin 10. gününde laminin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; Trofoblastik dev hücreler, damar duvarı ve bez epiteli orta şiddette immünreaktivite gösterdi. Stromal hücreler ve desidual hücreler zayıf boyandı.

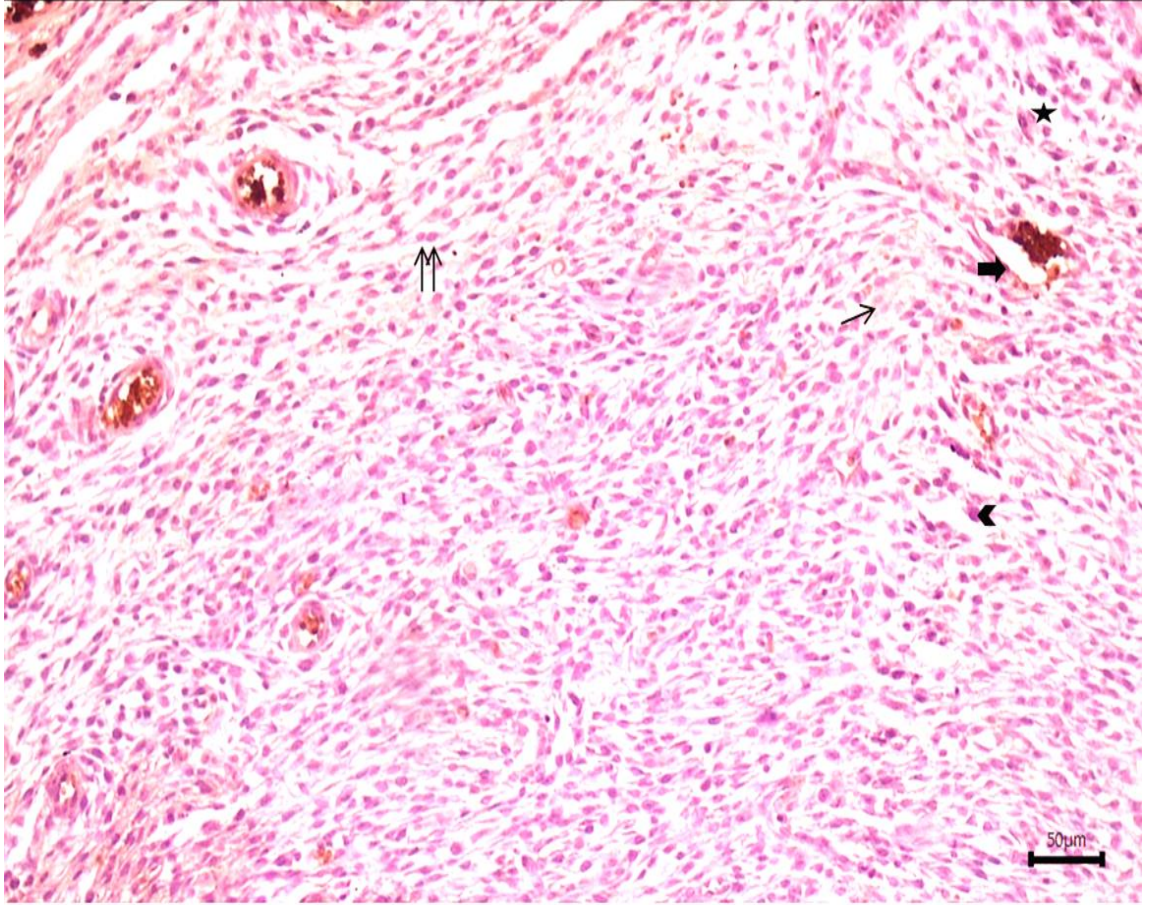


**Resim 8.** 10 günlük kök hücre grubu uterusuna ait kalsitonin immunohistokimyasal boyamaları.

a: bez epiteli (yıldız), damar duvarı (kalın ok), desidual hücre (çift ok), stromal hücre (uzun ince ok) X10. b: trofoblastik dev hücre (ok başı) X40.

#### 4.4.5. $\alpha V\beta 3$ İntegrin 10 günlük kontrol grubu bulguları

Kontrol grubunda gebeliğin 10. Gününde integrin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; endometriyum ve lümen arasındaki kalan bölge desidual alanı oluşturuyor. Desidual alanda trofoblastik dev hücreler görüldü. Trofoblastik dev hücreler, damar duvarı ve bez epiteli orta şiddette immünreaktivite gösterirken stromal hücreler ve desidual hücreler zayıf şiddette immünreaktivite gösterdi.

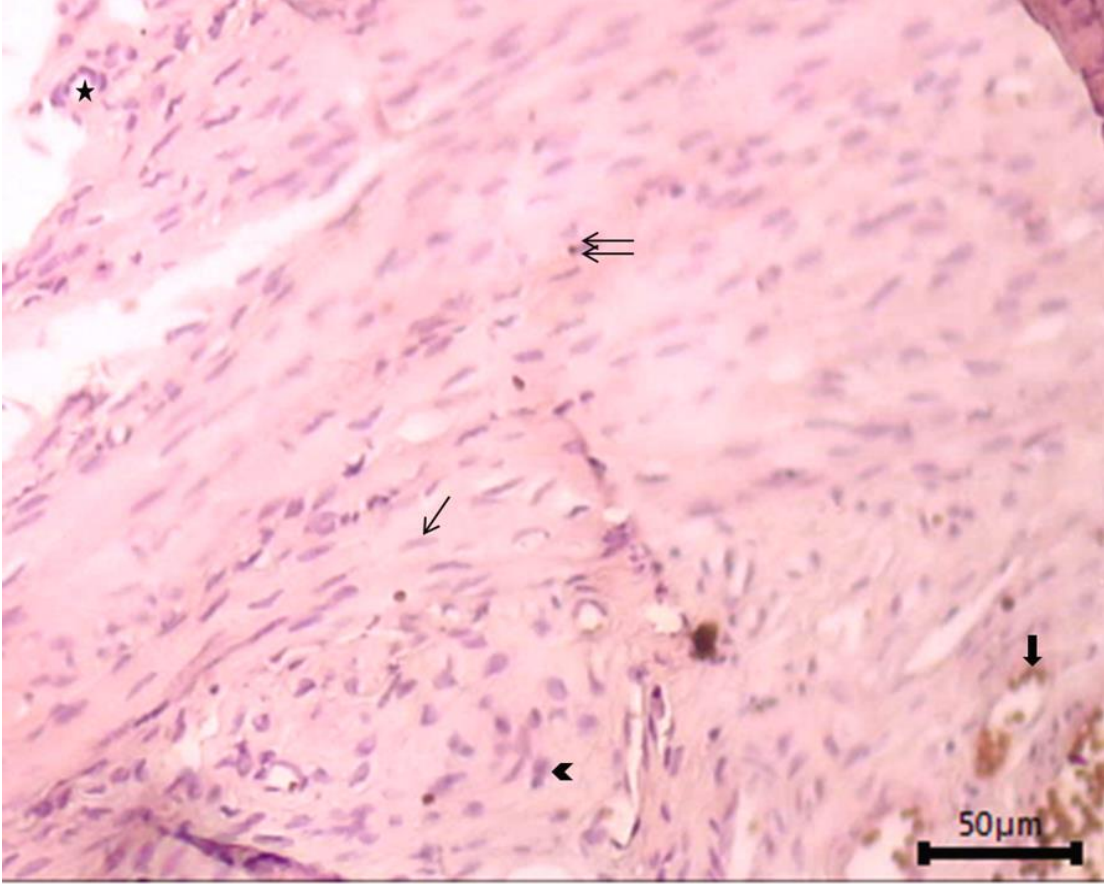


**Resim 9.** 10 günlük kontrol grubu uterusuna ait  $\alpha V\beta 3$  integrine ait immunohistokimyasal boyamaları.

Damar duvarı (kalın ok), trofoblastik hücre (ok başı), bez epiteli (yıldız), stromal hücre (uzun ince ok), desidual hücre (çift ok) X10.4.4.6.  $\alpha V\beta 3$  İntegrin 10 günlük kök hücre grubu bulguları

#### 4.4.6. $\alpha V\beta 3$ İntegrin 10 günlük kök hücre grubu bulguları

Kök hücre grubunda gebeliğin 10. gününde laminin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; trofoblastik dev hücreler orta şiddette immün reaktivite gösterdi. Stromal hücreler, desidial hücreler damar duvarı ve bez epiteli zayıf şiddette immünreaktivite gösterdi.

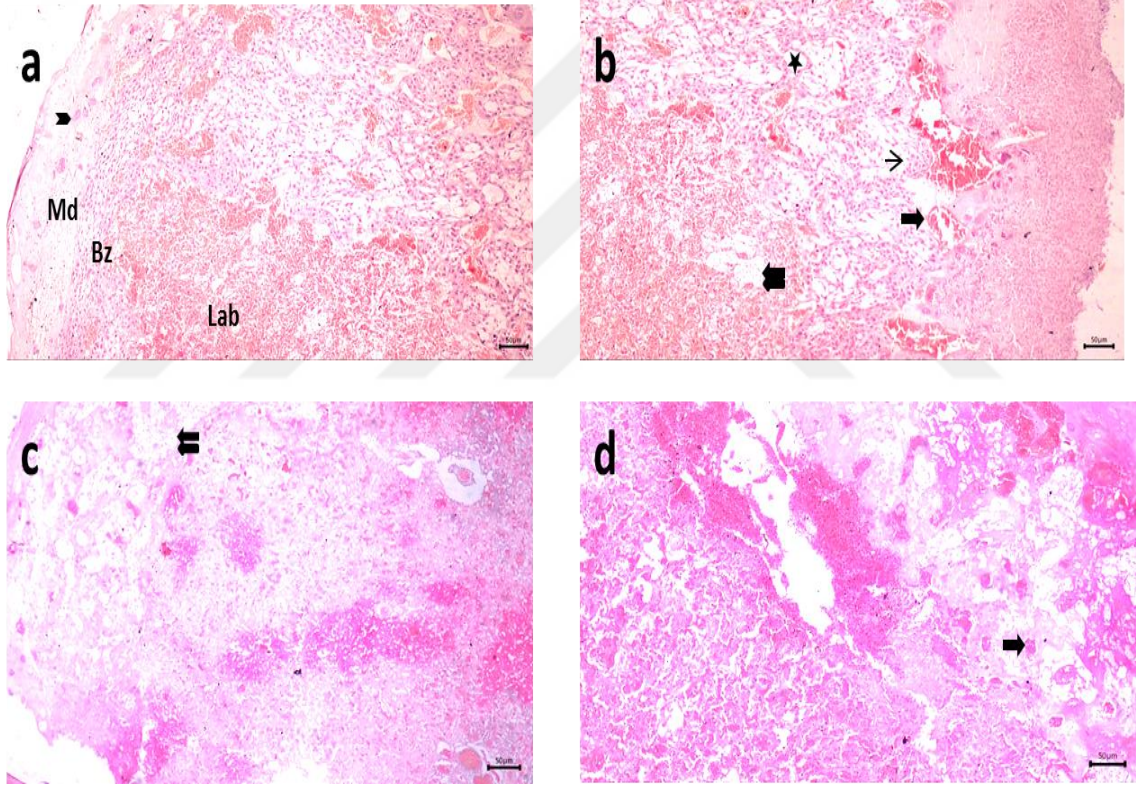


**Resim 10.** 10 günlük kök hücre grubu uterusuna ait  $\alpha V\beta 3$  integrine ait immunohistokimyasal boyamaları.

Damar duvarı (kalın ok), trofoblastik hücre (ok başı), bez epiteli (yıldız), stromal hücre (uzun ince ok), desidial hücre (çift ok) X10.

#### 4.5. 21 Günlük Hematoksilen-Eozin Histokimyasal Bulguları

21 günlük gebe sıçanlarda plasenta; bağlantı zonu, labirent tabakası ve maternal desidua olmak üzere 3 bölgeden oluşur. Plasenta gelişimini tamamlamıştı. Maternal desidua bölgesinde sitoplazmasındaki vakuoller ve granülleri yoğun boyanmış olan trofoblastik dev hücreler görüldü. Bağlantı zonunda; kan damarlarının sayısı ve glikojen bakımından zengin hücreler 10 günlüklere göre daha fazla görüldü. Spongiyotrofoblastların sayısı az sayıda görüldü. Labirent tabakasında glikojen bakımından zengin hücreler az sayıda gözlemlendi.



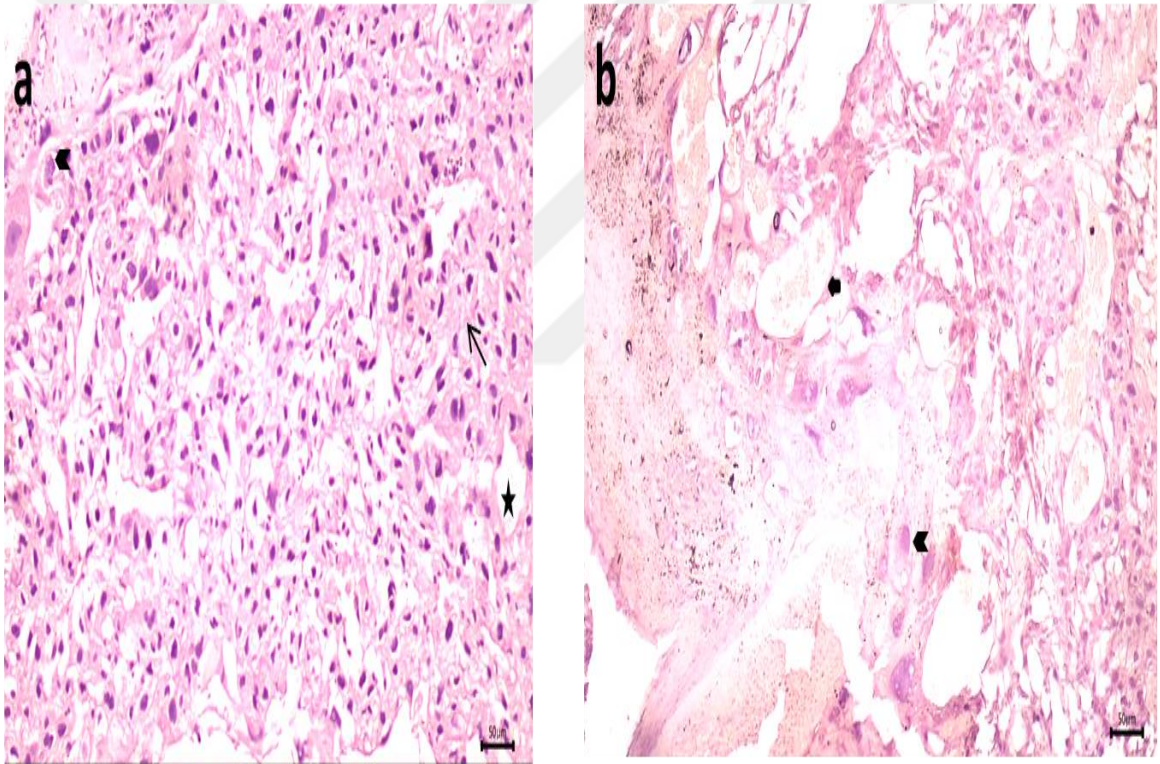
**Resim 11.** 21 günlük H-E boyamaları.

a: Maternal desidua (Md), Bağlantı zonu (Bz), Labirent tabakası (Lab) X4. b: bez epiteli (yıldız), glikojence zengin hücre grubu (çift kalın ok), damar duvarı (kalın ok), stromal hücre (uzun ince ok) X4. c: glikojence zengin hücre (çift kalın ok) X4. d: damar duvarı (kalın ok) X4.

## 4.6. 21 Günlük İmmünohistokimyasal Bulguları

### 4.6.1. Laminin 21 günlük kontrol grubu bulguları

Gebeliğin 21. gününde kontrol grubunda lamininin immünreaktivitesine bakıldığında; maternal desidua bölgesindeki trofoblastik dev hücreler orta şiddette boyanmıştır. Damar duvarı ve bez epiteli orta şiddette boyanmıştır. Bağlantı zonunda ve labirent tabakasında bulunan glikojence zengin hücre grubu orta şiddette boyandı. Stromal hücreler orta şiddette immünreaktivite gösterdi.

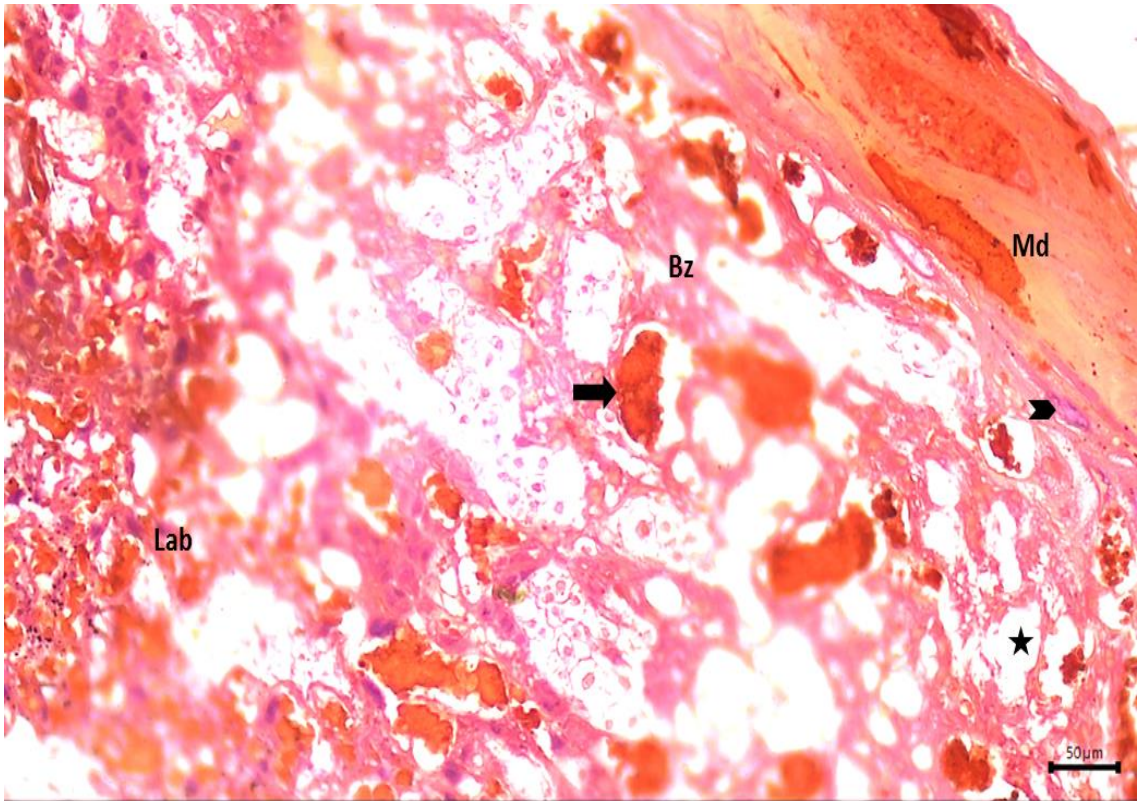


**Resim 12.** 21 günlük kontrol grubu uterusuna ait laminin immunohistokimyasal boyamaları.

a: trofoblastik dev hücre (ok başı), bez epiteli (yıldız),stromal hücre (uzun ince ok) X10. b:damar duvarı (kalın ok), trofoblastik dev hücre (ok başı) X10.

#### 4.6.2. Laminin 21 günlük kök hücre grubu bulguları

Kök hücre grubunda gebeliğin 21. gününde laminin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; trofoblastik dev hücreler, stromal hücreler, desidual hücreler, damar duvarı orta şiddette immün reaktivite gösterdi. Bez epiteli zayıf şiddette immünreaktivite gösterdi.

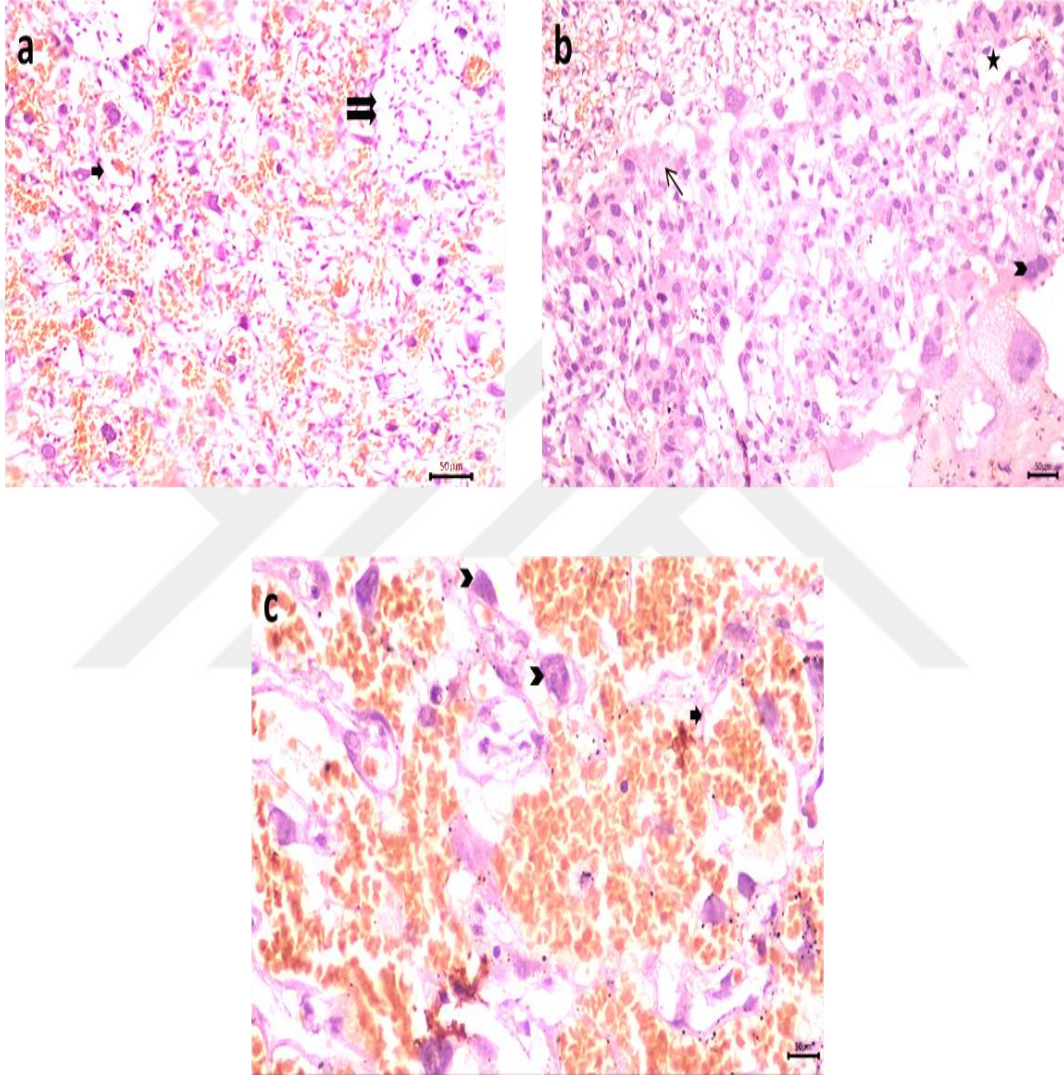


**Resim 13.** 21 günlük kök hücre grubu uterusuna ait laminin immunohistokimyasal boyamaları.

Maternal decidua (Md),bağlantı zonu (Bz), labirent tabakası (Lab), damar duvarı (kalın ok), trofoblastik dev hücre (ok başı), bez epiteli (yıldız) X10.

#### 4.6.3. Kalsitonin 21 günlük kontrol grubu bulguları

Gebeliğin 21. gününde kontrol grubunda kalsitonin immünreaktivitesine bakıldığında; trofoblastik dev hücreler, bez epiteli, glikojence zengin hücre grubu ve stromal hücreler ve damar duvarı orta şiddette immünreaktivite gösterdi.

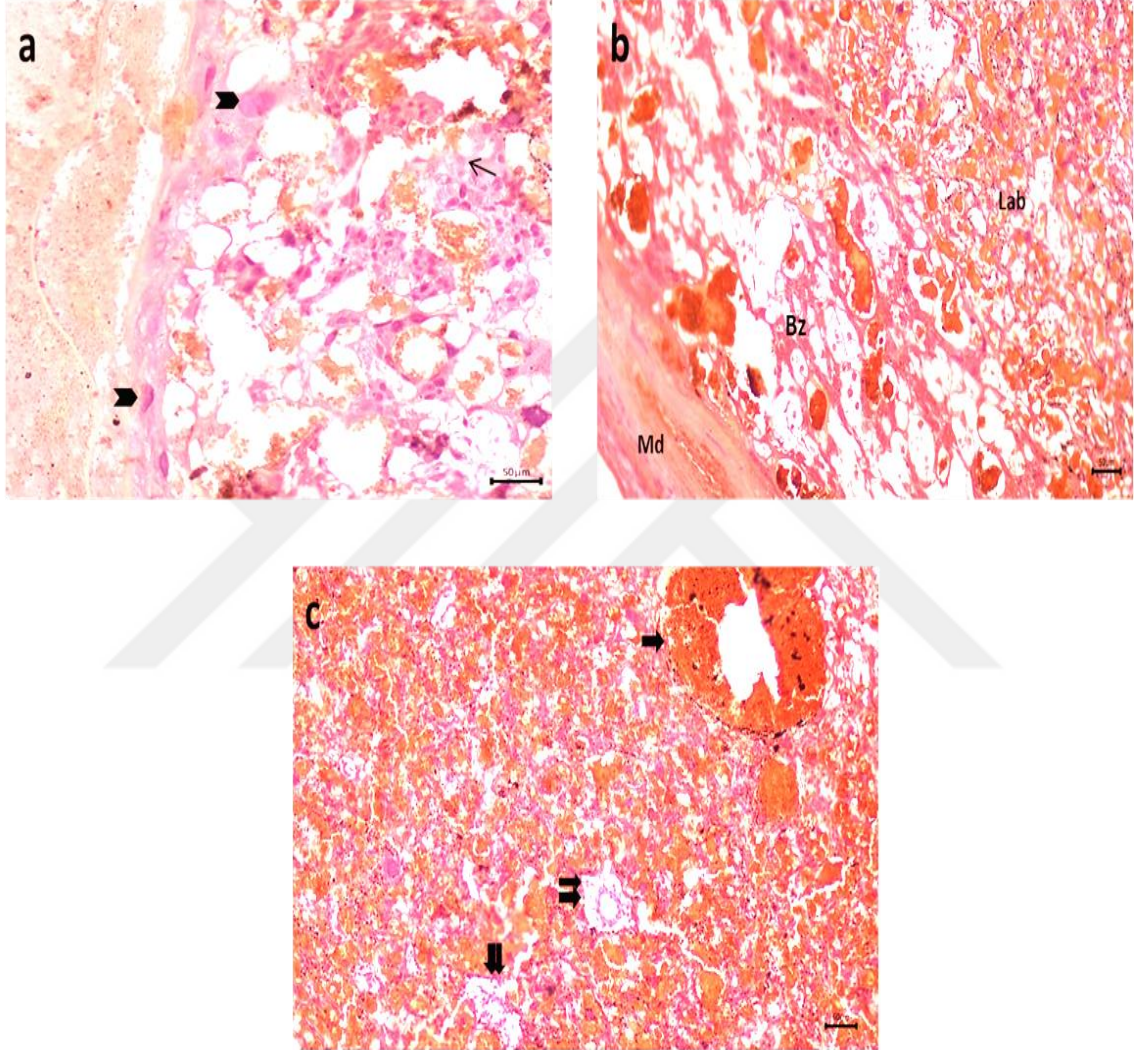


**Resim 14.** 21 günlük kontrol grubu uterusuna ait kalsitonin immunohistokimyasal boyamaları.

a: damar duvarı (kalın ok), glikojence zengin hücre grubu (çift kalın ok) X10. b: bez epiteli (yıldız), trofoblastik dev hücre (ok başı),stromal hücre (uzun ince ok) X10.c: trofoblastik hücre (ok başı),damar duvarı (kalın ok) X40.

#### 4.6.4. Kalsitonin 21 günlük kök hücre grubu bulguları

Kök hücre grubunda gebeliğin 21. gününde kalsitoninin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; trofoblastik dev hücreler, stromal hücreler, desidua hücreler, bez epiteli, damar duvarı orta şiddette immün reaktivite gösterdi.

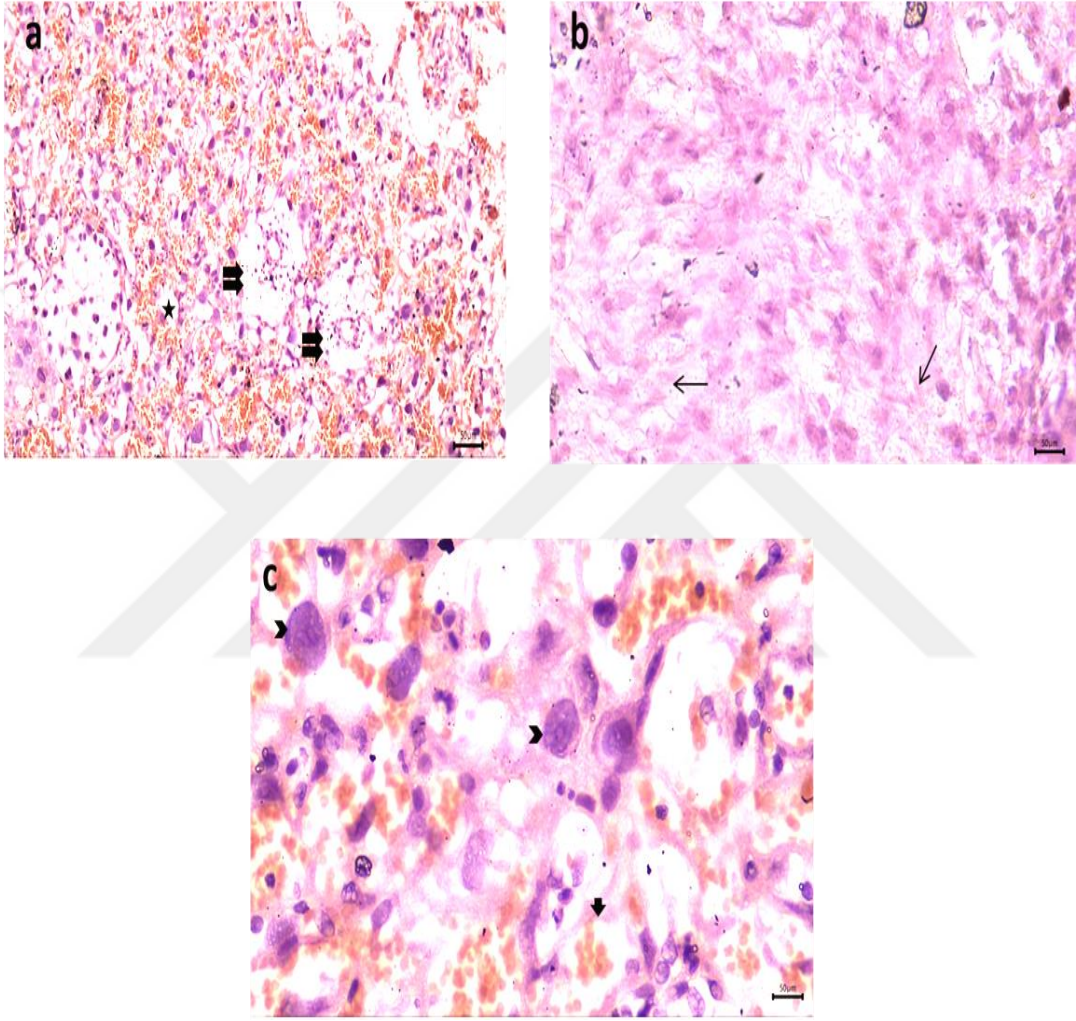


**Resim 15.** 21 günlük kök hücre grubu uterusuna ait kalsitonin immunohistokimyasal boyamaları.

a: trofoblastik hücre (ok başı), stromal hücre (uzun ince ok) X10. b: maternal desidua (Md), bağlantı zonu (bz), labirent tabakası (Lab) x10. c: glikojence zengin hücre grubu (çift kalın ok), damar duvarı (kalın ok) X10.

#### 4.6.5. $\alpha V\beta 3$ İntegrinin 21 günlük kontrol grubu bulguları

Kontrol grubunda gebeliğin 21. gününde integrin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; trofoblastik dev hücreler, stromal hücreler, desidual hücreler, bez epiteli, damar duvarı zayıf şiddette immünreaaktivite gösterdi.

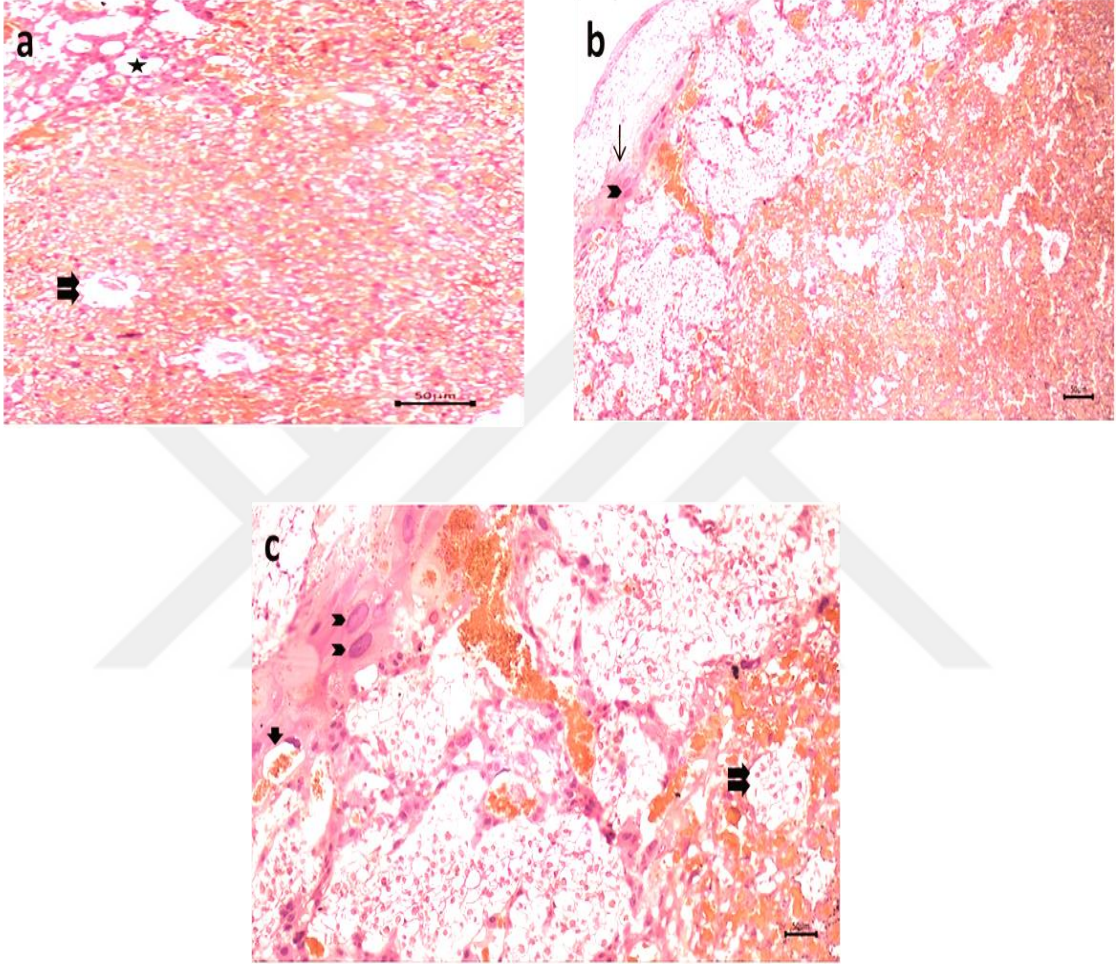


**Resim 16.** 21 günlük kontrol grubu uterusuna ait  $\alpha V\beta 3$  integrin immunohistokimyasal boyamaları.

a: glikojence zengin hücre grubu (çift kalın ok) X10. b: stromal hücre (uzun ince ok) X10. c: trofoblastik dev hücre (ok başı),damar duvarı (kalın ok) X40.

#### 4.6.6. $\alpha V\beta 3$ İntegrinin 21 günlük kök hücre grubu bulguları

Kök hücre grubunda gebeliğin 21. gününde integrinin ile immunohistokimyasal boyamada elde ettiğimiz bulgular; trofoblastik dev hücreler, stromal hücreler, desidual hücreler, damar duvarı, bez epiteli zayıf şiddette immünreaaktivite gösterdi.



**Resim 17.** 21 günlük kök hücre grubu uterusuna ait  $\alpha V\beta 3$  integrin immunohistokimyasal boyamaları.

a: glikojence zengin hücre grubu (çift kalın ok),bez epiteli (yıldız) X4. b: stromal hücre (uzun ince ok), trofoblastik dev hücre (ok başı) X4. c: trofoblastik dev hücre (ok başı), damar duvarı (kalın ok), glikojence zengin hücre grubu (çift kalın ok)X10.

## 5. TARTIŞMA

İmplantasyon, embriyonun uterusu yerleşmesi sürecidir. Embriyonun uterusu olan karşılıklı iletişiminin birçok ayrıntısı henüz ortaya çıkarılamamıştır. İmplantasyon süreci ve embriyonun uterusu ilk etkileşimleri, memelilerde türden türe farklılık göstermekle beraber, insan implantasyonunun incelenmesinde etik kısıtlamalar olması ve embriyo-uterus etkileşiminin moleküler düzeyde incelenmesinin zor olması, çalışmaların deney hayvanları üzerinde yapılma zorunluluğunu getirmektedir. Bu yüzden bu konuda elde edilen bilgilerin çoğu özellikle fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalara dayanmaktadır (Edizer, 2015).

Kemirgenlerde embriyo ilk olarak, fertilizasyondan sonraki 4. günde uterusun luminal epitelinin anti-mezometriyal bölgesine tutunur. Bu sırada stromada proliferasyon ve desidualizasyonla primer desidual zon şekillenir. Embriyonun uterus epiteline tutulmasıyla apoptozis gerçekleşir (D'Souza ve ark, 2007).

Sıçanlarda gebeliğin 7. gününde, uterusun endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç ana katmandan oluştuğu tespit edildi. Uterusa kan damarlarının girdiği mezometriyal bölgeyle, mezometrial bölgenin karşısında yer alan antimezometriyal bölgenin bulunduğu görüldü. Gebeliğin 11. günündeki sıçan plasentasında mezometriyal ve antimezometriyal bölgede iki ayrı desidual alan görülürken, mezometriyal bölgede gözlenen ve gelecekte koryoallantoyik plasentayı oluşturacak olan desiduanın, kan damarları bakımından daha zengin olduğu tespit edilmiştir (Erboğa, 2010). Bizim çalışmamızda da 10 günlük gebe sıçanlarda, antimezometriyal ve mezometriyal olmak üzere iki ayrı bölge gözlenirken, mezometriyal bölge kan damarları bakımından zengin olarak gözlemlendi.

21 günlük gebe sıçanlarda labirent tabakası ve bağlantı zonu olmak üzere 2 kısım ayırt edildiğini gözlemlenmiştir. Labirent tabakası fetal ve maternal kan sisternalarından zengin olmasına karşın sisternalarda çekirdeksiz eritrositlerin varlığını göstermişlerdir. Labirent tabakasının, maternal desidua yönünde spongiyotrofoblast tabakasıyla trofoblast dev hücrelerinin izlediğini tespit etmişlerdir. Spongiyotrofoblast tabakası, dıştan trofoblast dev hücreleriyle sarılmış ve sadece maternal kan adacıklarını içerdiğini tespit etmişlerdir (Er, 2007). Bizim çalışmamızda da 21 günlük gebe sıçanlarda labirent tabakası,

spongiofoblast hücreleri ve maternal desidua trofoblast dev hücrelerinin varlığı tespit edildi.

Farelerde yapılan bir çalışmada kontrol grubunda, gebeliğin 2. 4. ve 6. günlerinde endometriyum yüzey ve bez epitelinin altında yer alan bazal membranda lamininle kuvvetli işaretlenmeler izlenmiştir (Yetkin, 2011). Bizim çalışmamızda 10 günlük gebe sıçanlarda bez epitelinin altındaki bağ dokusunda lamininle orta düzeyde işaretleme tespit edildi. 21 günlük gebe sıçanlarda ise bez epitelinde orta düzeyde laminin immünreaktivitesi tespit edildi.

Sıçanlarda gebeliğin 10. gününde kan damarlarının bazal membranında bulunan laminin kuvvetli bir immünreaktivite göstermiştir (Kaloğlu, 2000). Çalışmamızda 10 günlük gebe sıçanlarda laminin, damar duvarında orta derecede immünreaktivite göstermiştir.

Endometriyum; adezyon moleküllerinden olan integrinlerden zengin bir bölgedir. Integrinler; fertilizasyon, implantasyon ve ilk blastula oluşumunu içeren erken gelişimsel olaylarda önemli rol oynamaktadır (Bowen ve Hunt,2000). Bizde çalışmamızda 10 günlük kontrol grubunda  $\alpha V\beta 3$  integrinin immünreaktivitesinin 21 günlük gebe sıçanlara göre daha yüksek olduğunu tespit ettik.

Başka bir çalışmada gebeliğin 7. günündeki kontrol grubuna ait farelerde, antimezometriyal ve mezometriyal bölgenin lümen epitelinde, desidua alandaki stromal hücrelerde, damar duvarlarında  $\alpha V\beta 3$  integrinin immünreaktivitesinin zayıf boyanma gösterdiğini tespit etmişlerdir (Özcan,2010). Bizim çalışmamızda da 10 günlük ve 21 günlük sıçanlarda damar duvarında ve bez epitelinde  $\alpha V\beta 3$  integrinin zayıf immünreaktivite gözlenmiştir.

Sıçan endometriyum epitel hücrelerinde endometrial reseptivitenin bir belirteci olarak  $\alpha V\beta 3$  ekspresyonu ve bu molekülün bu türlerde implantasyon sürecinde kaçınılmaz olduğu immünohistokimyasal ve akım sitometrik çalışmalarla gösterilmiştir (Srinivasan ve ark,2009).

Günümüzde  $\alpha V\beta 3$  integrinleri implantasyon için işlevsel belirteç olarak kabul edilir.  $\alpha V\beta 3$  yetersiz sentezi sonucunda; düşükler ve implantasyonda başarısızlık görülür ( Tei ve ark, 2003).

Yapılan alışmalar neticesinde fare ve insan endometriyal epitelinde, implantasyon penceresi döneminde geçici olarak kalsitonin eksprese edildiği ve bu ekspresyonunun progesteron tarafından düzenlendiğini kanıtlanmıştır (Ding ve ark,1994). Endometriyumdan salgılanan kalsitoninin, kalsiyum homeostasisinin kontrolünde rol aldığı ve bunun sonucunda implantasyon bölgesinde otokrin ve parakrin etki gösterdiği ispatlanmıştır. Diğer steroid uyarımlı gen proteinlerine benzer şekilde endometriyal proliferasyon, sekresyon ve desidualizasyonun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir ( Simon ve ark,2000). Yapılan alışmalar sonucunda kalsitonin hormonu ve reseptörünün , endometriyum üzerindeki etkileri implantasyonu desteklediği şeklinde olup, implantasyon öncesi endometriyumdaki bu geçici kalsitonin ekspresyonunun blastosist implantasyonu için önemli bir sinyal sağladığını düşündürmektedir (Li ve ark, 2002). Eğer kalsitonin inhibe edilirse implantasyon olasılığının düştüğü gösterilmiştir. Kalsitonin m-RNA'sı ve protein ekspresyonundaki %90 oranındaki azalmanın sonucunda implantasyon % 50 kadar azalttığı gösterilmiştir (Kumar ve ark,1998).

Yapılan literatür taramalarımız sonucunda, mezenşimal kök hücrenin implantasyon bölgesi üzerine etkisini içeren bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda sıçanlarda mezenşimal kök hücrenin implantasyon bölgesindeki laminin, kalsitonin ve  $\alpha\beta3$  integrine etkisini ve immunolokalizasyonunu göstermeyi amaçladık. Yapılan incelemeler sonucunda;

➤ Bağ dokusu bileşenlerinden lamininin, immünreaktivitesinin 10. günlük ve 21. günlük gebe sıçanlardan aldığımız kesitlerde deney ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı,

➤ Kalsitonin hormonunun, immünreaktivitesinin 10 günlük ve 21. günlük gebe sıçanlardan aldığımız kesitlerde deney ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı,

➤ Adhezyon moleküllerinden  $\alpha\beta3$  integrinin immünreaktivitesinin 10. günlük gebe sıçanlardan, aldığımız kesitlerde integrinin değerlerinin deney grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

İmplantasyon dinamik ve karmaşık bir süreç olduğundan mezenşimal kök hücrenin implantasyonda görevli diğer moleküller üzerine etkisinin incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Sebebi bilinmeyen düşük etyolojisinde implantasyonda görevli diğer moleküllerin araştırmalara katkı sunacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Abraham L., Kierszenbaum**, Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Ankara, 2006,578-592.
- Achache H, Revel A.** Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Human Reproduction Update, 2006; 12: 731-746
- Akay T.** Sitoloji. Palme yayıncılık,5.baskı, Ankara, 2010,89-90.
- Arıncı K, Elhan A,** Anatomi 1. Cilt. 4. Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara, 2006, 340-345.
- Ayyıldız A, Nuhoglu B, Gülerkaya B.** Effect of intraurethral mitomycin- C on healing and fibrosis in rats with experimentally induced urethral stricture. International Journal Of Urology 2004;11:1122-1126.
- Bahar L, Baykal T.** Endometrial reseptivitenin implantasyondaki rolü. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1(2):2008
- Bahar L, Kahraman S, Akkuş M, Baykal T.** Fertil kadınlar ve implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlarda endometriumun ince yapı ve immünohistokimyasal değerlendirilmesi. Dicle Tıp Dergisi, 2012; 39 (2): 269-275.
- Başimoğlu Koca Y.** Histoloji Atlası. Nobel Yayıncılık, Ankara, 2012, 169-170.
- Bowen JA, Hunt JS.** The Role of Integrins in Reproduction. P.S.E.B.M, 2000; 223:331-343.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patell B.** Adipose -derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. s.1 . : Methods. 2008; 45: 115-20.
- Can A.** Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. Akademisyen Tıp Kitabevi, Ankara, 2014, 41-42.
- Cannazik O, Polat B.** Kök Hücre ve Veteriner Hekimlikte Uygulama Alanları. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2014; 9(3): 198-205
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K.** Embryo Implantation. Developmental Biology, 2000; 223: 217-237. 2
- Cha J, Sun X, Dey SK.** Mechanisms of implantation, strategies for successful pregnancy, Nat Med. Nature Publishing Group, 2012. 18, 1754–1767.
- D’Souza S. S, Daikoku T, Farach-Carson M. C, Carson D. D.** Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. Biology of Reproduction, 77, 433–441, 2007.
- Demir R.** İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi, Palme yayıncılık, Bölüm 4, 1995,114-116.

- Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G.** The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Human Reproduction*, 2007; 1–13.
- Ding Y. Q, Zhu, L. J, Bagchi, M. K, and Bagchi, I. C.** Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology* 1994; 135: 2265-2274
- Dong YL, Vegiraju S, Gangula PR, Kondapaka S, Wimalawansa SJ, Yallampalli C.** Expression and regulation of calcitonin gene-related peptide receptor in rat placentas. *Biol Reprod* 2002; 67: 1321-1326.
- Edizer İ.** Farelerde erken gebelik boyunca uterusu bazı notch sinyal yolağı üyelerinin ekspresyonu, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Doktora Tezi, 2015.
- Er H.** Normal ve Dekametazon Verilen Sıçan Plasentasında Hücre Siklusu Proteinlerinden Siklin-E,PCNA ve P27'nin Dağılımı, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Doktora Tezi, 2007.
- Erboğa M.** Sıçanlarda plasenta gelişiminin morfolojik olarak incelenmesi. Trakya Üniversitesi, Edirne, Yüksek lisans tezi, 2010.
- Erdost H,** Veteriner Özel Histoloji,3. Baskı. Nobel Kitabevi,Ankara,2011,234-238.
- Ergüler G, Demir N, Demir R.** Structural properties and functions of adhesion molecules. *T Klin J Med Sci*, 2002; 22:313-327.
- Friedenstein Aj, Gorskaja JF, Kulagina NN,** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs 19764(5):267-74
- Gartner L P, Hatt JL.** Dişi Üreme Sistemi, Renkli Histoloji Atlası. Güneş Tıp Kitabevleri,İstanbul,2008,360-364.
- Gellersen B, Brosens J.** Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human Endometrium, a decidualizing affair. *J Endocrinol.*,2003, 178:357–372.
- Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM.** Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast derived signals. *Hum Reprod.* 2010, 25:862-873.
- Gökçimen A, Temel S.** İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 11/4, 25-33, 2004.
- Gürsoy E, Ergin K.** Dişi Üreme Sistemi Atlası, Nobel tıp kitapevleri, 2007, 12-15.
- Gürsoy E, Koptagel E, Ergin K.** Hücre, dokular, genel embriyoloji, 2009. Adnan Menderes Üniversitesi yayınları, 31: 211-212
- Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM.** Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiological Reviews*, 2005;85(3):979– 1000.

**Hsu SM, Raine L, Fanger H.** Use of avidinbiotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.

**Hwang, N.S., Zhang, C., Hwang, Y.S., Varghese, S.,** Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine, *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine*, 1, 97-106, 2009.

**Illera MJ, Emily Cullinan, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA.** Blockade of  $\alpha V\beta 3$  the Integrin Adversely Affects Implantation in the Mouse. *Biology of Reproduction*, 2000; 62:1285– 1290.

**Illera MJ, Lorenzo PL, Gui YT, Beyler SA, Apparao KBC, Lessey BA.** A role for  $\alpha V\beta 3$  integrin during implantation in the rabbit model. *Biol Reprod*, 2003; 68:766–771

**Inagaki J, Sugiura-Ogasawara M, Nomizu M, Nakatsuka M, Ikuta K, Suzuki N, Kaihara K, Kobayashi K, Yasuda T, Shoenfeld Y, Matsuura KA.** An association of IgG anti-laminin1 autoantibodies with endometriosis in infertile patients. *Human Reproduction*, 2003;18:544-549.

**Inagaki J, Kondo A, Lopez LR, Shoenfeld Y, Matsuura E.** Pregnancy loss and endometriosis: pathogenic role of anti-laminin-1 autoantibodies. *The New York Academy of Sciences*, 2005;1051:174-184

**Junqueira CL, Carneiro J.** *Temel Histoloji.* Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 2003, 458-461

**Kaloğlu C.** Sıçan implantasyonunda decidualizasyon ve ekstraselüler matriks değişiklikleri: Histokimyasal, İmmünohistokimyasal ve Ultratrüktrel Bir Çalışma. Cumhuriyet üniversitesi, Sivas, 2000.

**Kasahara K, Takakura K, Takebayashi K, Kimura F, Nakanishi K, Noda Y.** The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:1281–1286, 2001.

**Kayışlı A.Ü., Asar M., Demir R..** 2Ratlarda Desidualizasyon Süresince Ekstrasellüler Matriksin Yeniden Modellenmesinde Laminin ve Fibronektin ile Reseptör Altbirimleri İntegrin  $\beta 4$  ve  $\alpha 5$ 'in Dağılımları ve Muhtemel Roller. 2000, *Turk J Biol* 24 (2000) 379–395.

**Kierszenbaum AL, Tres LL.** *Histology and Cell Biology : An Introduction to Pathology.* 3. baskı. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012

**Kokuba T, Uchida H, Choi ET, Louis S.** Integrin  $\alpha V\beta 3$  as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. *J Vasc Surg*, 2007; 45:33A-38A.

- Kumar S, Zhu LZ, Polihronis M, Cameron ST, Baird DT, Schatz F** . Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4443–4450.
- Kürkçü G**. Fare embriyonik kök hücrelerinden kondrosit farklılaştırılması ve mezenşimalkök hücrelerinden farklılaştırılan kondrositlerle karşılaştırılması. İzmir, 2012
- Li Q, Wang J, Armant DR, Bagchi MK, Bagchi IC**. Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *J Biol Chem* 2002; 277: 46447-46455
- Liu, Y., Wu, J., Zhu, Y., Han, J.** Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases, *Clinical and Experimental Medicine*, 2014,14, 13-24.
- Madazlı R**. Plasenta . Nobel Tıp Kitapevi, 2008, 11-30.
- Matur İ., Solmaz S**. Kök hücre üretiminde güncel yaklaşımlar. *Arşiv* 2011; 20: 168
- Meinel, L., Karageorgiou, V., Fajardo, R., Snyder, B., Shinde-Patil, V. Zichner, L., Kaplan, D., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G.**, Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium akım, *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 112-22, 2004
- Oruç H**. Hiyaluronik asit'in endometriyum dokusunda  $\alpha\beta 3$  integrin ve matriks metalloproteinaz ekspresyonuna etkisi. Denizli, 2013.
- Ovale WK, Nahirney PC**, Netter Temel Histoloji. Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2009, 412-413.
- Ozan H**, Ozan Anatomi, 2. Baskı. Klinisyen Tıp Kitabevleri, Ankara, 2005, 316-319.
- Özcan T**. Diyabetin, implantasyon penceresi dönemindeki sıçan endometriyumunda  $\alpha\beta 3$  integrin ekspresyonuna ve ince yapıya etkisi. Mersin, 2010.
- Özen A, Sancak Gül İ**. Mezenşimalkök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61, 79-84, 2014.
- Özer A, İzzetoğlu Turgay G**, Histoloji, Üreme Sistemi, Bölüm 16, Ankara, 2010, 240-241.
- Ross H. Michael, Pawlina Wojciech**, Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Bölüm 23, Palme yayıncılık, Ankara, 2014, 848-852.
- Sadler T. W.** . Medikal Embriyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara, 2011, 98-253.
- Simon C, Martin JC, Pellicer A**. Paracrine regulators of implantation. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2000; 14(5): 815-826.
- Skibber JM Minsky BD, Hoff PM**, Cancer of the colon. In: De Vita VT Hellman. Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins, 2001; 1216-70.

- Srinivasan, K. R.** Blesson, C. S., Fatima, I., Kitchlu, S., Jain, S. K., Mehrotra, P. K., Dwivedi, A. Expression of  $\alpha V\beta 3$  integrin in rat endometrial epithelial cells and its functional role during implantation. *Gen Comp Endocrinol.*, 2009,160: (2) 124-33.
- Şahin E, Ozerdoğan Bayçu C, Koparal Tansu A, Dönmez Burukoğlu D, Bektur N. Ezgi.** Mezenşimal Kök Hücre Sitokinlerinin Kanser Hücreleri Üzerine Olumsuz Etkileri. *Osmangazi Tıp Dergisi* 2015, 37(3), 7-12.
- Şahin F, Saydam G, Omay SB.** Kök hücre plastisite ve klinik pratikte kök hücre tedavisi.s.1.: *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi.* 2005;1(15):48-56.
- Şeftalioğlu A,** Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi,3.Baskı.Tıp ve Teknik Yayıncılık,Ankara,1998,58-59.
- Tei, C., Maruyama, T., Kuji, N., Miyazaki, T., Mikami, M., and Yoshimura Y.** (2003) Reduced expression of  $\alpha V\beta 3$  integrin in the endometrium of unexplained infertility patients with recurrent IVF-ET failures: improvement by danazol treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*,2003, 20: (1) 13-20.
- Vatansever H.S., İnan V.S., Kayıkçıoğlu Ö, Özbilgin M.K.** Fare Retinasında Laminin Ve Tip IV Kollajen Dağılımlarının Faz Kontrast, Normanski VeFlüoresan Objektifleri İle Gösterilmesi *T Klin J Med Sci* ,2001, 21:260-263.
- Yetkin D.** Diyabetin, implantasyon penceresi dönemindeki fare endometriyumunda laminin ekspresyonuna ve ince yapıya etkisi.Mersin Üniversitesi, Yüksek lisans tezi, Mersin, 2011.
- Zhu Li-Ji, Bagchi Milan K., Bagchi Indrani C.** Attenuation of Calcitonin Gene Expression in Pregnant Rat Uterus Leads to a Block in Embryonic Implantation. 1998, *Endocrinology* 139: 330–339.

## EKLER

**EK 1.** 10 günlük gruplar arasında Laminin, Kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrin immünekspresyonunun skorlama sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi

Ek 1.1. 10 günlük gruplar arasında Laminin immünekspresyonunun skorlama sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi

<b>10. gün Laminin</b>	<b>Deney</b>	<b>Kontrol</b>	
<b>Bölge</b>	<b>Ortanca</b> <b>(min-maks)</b>	<b>Ortanca</b> <b>(min-maks)</b>	<b>p</b>
	<b>Ort±S</b>	<b>Ort±S</b>	
<b>Damar Duvarı</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.60±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.60±0.21	1.000
<b>Bez epiteli</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.60±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.60±0.21	1.000
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	1.000
<b>Stromal Hücreler</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	1.000
<b>Desidual Hücreler</b>	0.5 (0.2-0.8) 0.50±0.19	0.5 (0.2-0.8) 0.50±0.19	1.000

Ek 1.2. 10 günlük gruplar arasında Kalsitoninin immünekspresyonunun skorlama sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi

<b>10. gün Kalsitonin</b>	<b>Deney</b>	<b>Kontrol</b>	
<b>Bölge</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ortanca</b>	<b>p</b>
	<b>(min-maks)</b>	<b>(min-maks)</b>	
	<b>Ort±S</b>	<b>Ort±S</b>	
<b>Damar Duvarı</b>	0.5 (0.2-0.8) 0.50±0.19	0.5 (0.2-0.8) 0.50±0.19	1.000
<b>Bez epiteli</b>	0.5 (0.2-0.8) 0.55±0.23	0.5 (0.2-0.8) 0.55±0.23	1.000
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	1.000
<b>Stromal Hücreler</b>	0.4 (0.1-0.8) 0.46±0.21	0.4 (0.1-0.8) 0.44±0.23	0.878
<b>Desidual Hücreler</b>	0.3 (0.1-0.6) 0.33±0.21	0.4 (0.1-0.8) 0.41±0.24	0.505

Ek 1.3. 10 günlük gruplar arasında  $\alpha V\beta 3$  integrinin immünekspresyonunun skorlama sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi

<b>10. gün <math>\alpha V\beta 3</math> İntegrin</b>	<b>Deney</b>	<b>Kontrol</b>	
<b>Bölge</b>	<b>Ortanca</b> <b>(min-maks)</b> <b>Ort±S</b>	<b>Ortanca</b> <b>(min-maks)</b> <b>Ort±S</b>	<b>p</b>
<b>Damar Duvarı</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.003
<b>Bez epiteli</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.003
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.003
<b>Stromal Hücreler</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.5 (0.2-0.8) 0.50±0.19	0.005
<b>Desidual Hücreler</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.4 (0.2-0.6) 0.43±0.17	0.021

**EK 2.** 21 günlük gruplar arasında Laminin, Kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  integrin immünoekspresyonunun skora sonucunda elde edilen değerlerin istatistiksel analizi

**Ek 2.1.** 21 günlük gruplar arasında Lamininin immünoekspresyonunun skora sonucunda elde edilen değerlerin istatistiksel analizi

<b>21. gün Laminin</b>	<b>Deney</b>	<b>Kontrol</b>	
<b>Bölge</b>	<b>Ortanca</b> <b>(min-maks)</b> <b>Ort±S</b>	<b>Ortanca</b> <b>(min-maks)</b> <b>Ort±S</b>	<b>p</b>
<b>Damar Duvarı</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	1.000
<b>Bez epiteli</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.003
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	1.000
<b>Stromal Hücreler</b>	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	1.000
<b>Glikojence Zengin Hücreler</b>	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.789

Ek 2.2. 21 günlük gruplar arasında Kalsitoninin immünekspresyonunun skortama sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi

<b>21. gün Kalsitonin</b>	<b>Deney</b>	<b>Kontrol</b>	
<b>Bölge</b>	<b>Ortanca</b> <b>(min-maks)</b> <b>Ort±S</b>	<b>Ortanca</b> <b>(min-maks)</b> <b>Ort±S</b>	<b>p</b>
<b>Damar Duvarı</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	1.000
<b>Bez epiteli</b>	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	1.000
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	1.000
<b>Stromal Hücreler</b>	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	0.5 (0.2-0.8) 0.53±0.21	1.000
<b>Glikojence Zengin Hücreler</b>	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	0.6 (0.2-0.8) 0.55±0.21	1.000

Ek 2.3. 21 günlük gruplar arasında  $\alpha V\beta 3$  integrinin immünekspresyonunun skorlama sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi

<b>21. gün <math>\alpha V\beta 3</math> İntegrin</b>	<b>Deney</b>	<b>Kontrol</b>	
<b>Bölge</b>	<b>Ortanca</b>	<b>Ortanca</b>	<b>p</b>
	<b>(min-maks)</b>	<b>(min-maks)</b>	
	<b>Ort±S</b>	<b>Ort±S</b>	
<b>Damar Duvarı</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	1.000
<b>Bez epiteli</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	1.000
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	1.000
<b>Stromal Hücreler</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	1.000
<b>Glikojence Zengin Hücreler</b>	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	0.2 (0.1-0.4) 0.21±0.12	1.000

**EK 3.** 10 günlük gebe sıçan grupları arasında laminin, kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  immünekspresyonunun histoskorlama sonucu elde edilen değerleri

Ek 3.1. 10 günlük Lamininin immunolokalizasyonu (Ş: Şiddet, Y: Yoğunluk)

10. gün Laminin	Deney		Kontrol	
	Ş	Y	Ş	Y
Damar Duvarı	++	<% 26-50	++	<% 26-50
Bez epiteli	++	<% 26-50	++	<% 26-50
Trofoblastik Dev Hücreler	++	<% 26-50	++	<% 26-50
Stromal Hücreler	++	<% 26-50	++	<% 26-50
Desidual Hücreler	++	<% 26-50	++	<% 26-50

Ek 3.2. 10 günlük Kalsitoninin immunolokalizasyonu (Ş: Şiddet, Y: Yoğunluk)

10. gün Kalsitonin	Deney		Kontrol	
	Ş	Y	Ş	Y
Damar Duvarı	++	% 26-%50	++	% 26-%50
Bez epiteli	++	<% 26-50	++	<% 26-50
Trofoblastik Dev Hücreler	++	% 26-%50	++	% 26-%50
Stromal Hücreler	+	% 26-%50	+	% 26-%50
Desidual Hücreler	+	<% 26-50	++	<% 26-50

Ek 3.3. 10 günlük  $\alpha V\beta 3$  integrinin immunolokalizasyonu (Ş: Şiddet, Y: Yoğunluk)

10. gün $\alpha V\beta 3$ integrin	Deney		Kontrol	
	Ş	Y	Ş	Y
Damar Duvarı	+	<%25	++	%26-%50
Bez epiteli	+	<%25	++	%26-%50
Trofoblastik Dev Hücreler	++	<%25	++	%26-%50
Stromal Hücreler	+	<%25	+	%26-%50
Desidual Hücreler	+	<%25	+	%26-%50

**EK 4.** 21 günlük gebe sıçan grupları arasında laminin, kalsitonin ve  $\alpha V\beta 3$  immünekspresyonunun histoskorlama sonucu elde edilen değerleri

Ek 4.1. 21 günlük Lamininin immunolokalizasyonu (Ş: Şiddet, Y: Yoğunluk)

21. gün Laminin	Deney		Kontrol	
	Ş	Y	Ş	Y
<b>Bölge</b>				
<b>Damar Duvarı</b>	++	%26-%50	++	%26-%50
<b>Bez epiteli</b>	+	<%25	++	%26-%50
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	++	%26-%50	++	%26-%50
<b>Stromal Hücreler</b>	++	%26-%50	++	%26-%50
<b>Glikojence Zengin Hücre Grubu</b>	++	%26-%50	++	%26-%50

Ek 4.2. 21 günlük Kalsitoninin immunolokalizasyonu (Ş: Şiddet, Y: Yoğunluk)

21. gün Kalsitonin	Deney		Kontrol	
	Ş	Y	Ş	Y
<b>Bölge</b>				
<b>Damar Duvarı</b>	++	%26-%50	++	%26-%50
<b>Bez epiteli</b>	++	%26-%50	++	%26-%50
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	++	%26-%50	++	%26-%50
<b>Stromal Hücreler</b>	++	%26-%50	++	%26-%50
<b>Glikojence Zengin Hücre Grubu</b>	++	%26-%50	++	%26-%50

Ek 4.3. 21 günlük  $\alpha V\beta 3$  İntegrinin immunolokalizasyonu (Ş: Şiddet, Y: Yoğunluk)

21. gün $\alpha V\beta 3$ İntegrin	Deney		Kontrol	
	Ş	Y	Ş	Y
<b>Bölge</b>				
<b>Damar Duvarı</b>	+	<%25	+	<%25
<b>Bez epiteli</b>	+	<%25	+	<%25
<b>Trofoblastik Dev Hücreler</b>	+	<%25	+	<%25
<b>Stromal Hücreler</b>	+	<%25	+	<%25
<b>Glikojence Zengin Hücre Grubu</b>	+	<%25	+	<%25

Ek 5. Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 25 Şubat 2016

**Oturum** : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2016 Yılı II. Oturumu  
**Sayı** : 64583101/2016/58  
**Proje Başlığı** : Sığırlarda mezenşimal kök hücrenin implantasyon bölgesindeki laminin, kalsitonin ve  $\alpha\text{V}\beta 3$  integrine etkisi  
**Proje Yürütücüsü** : Nezihce Tülin BOYLU  
**Proje Ekibi** : Gülferm ERSOY

**Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:**

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması  
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması  
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

**Hayvan Çalışması**

İnsanlarda araştırma  
İnsan olmayan primatların kullanılması  
Transgenik hayvanların kullanılması  
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik aşrdan bir sakınca bulunmamaktadır.

  
Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN

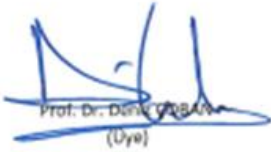
(Başkan)

  
Prof. Dr. Ferhan DOST

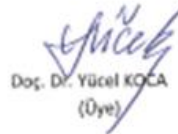
(Başkan Yrd.)

  
Prof. Dr. Hüseyin SÖNMEZ

(Üye)

  
Prof. Dr. Deniz YILBAY

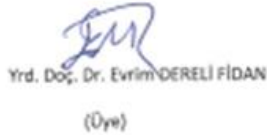
(Üye)

  
Doç. Dr. Yücel KOCA

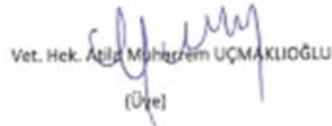
(Üye)

  
Vet. Hek. Serdar AKTAŞ

(Üye)

  
Yrd. Doç. Dr. Evrim DERELİ FIDAN

(Üye)

  
Vet. Hek. Atilla Muharrem UÇMAKLIOĞLU

(Üye)

  
Yurdagül ALTINBAŞ

(Üye)

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

# ÖZGEÇMİŞ

**Adı, Soyadı** : Gülfem ERSOY  
**Doğum yeri ve tarihi** : Mersin 16.05.1992  
**Medeni Durumu** : Bekar  
**Telefon** : 0 507 016 27 51  
**E-mail** : gulfemersoy.1@gmail.com  
**Yabancı Dil** : İngilizce

## EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	2014-2017
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010-2014

## 2. PROJELER

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Sıçanlarda mezenşimal kök hücrenin implantasyon bölgesindeki laminin,kalsitonin ve $\alpha\beta3$ integrine etkisi	Adnan Menderes Üniversitesi	7500	27.04.2016	Araştırmacı	Kurumsal (BAP)

## 3. SERTİFİKALAR

- 2017** Formasyon Sertifikası, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- 2016** 1. Kök hücre ve Biyoetik Sempozyumu Katılım sertifikası, Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla.
- 2014** Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, Türkiye.
- 2013** Ege Üniversitesi Ebiltem Kanser Biyolojisi ve Genetiği Sempozyumu Katılım sertifikası, İzmir, Türkiye.
- 2013** Özel Mersin İmc Hastahanesi Mikrobiyoloji laboratuvarı staj Sertifikası, Mersin
- 2012** Dr. Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastahanesi Biyokimya laboratuvarı staj Sertifikası, Lefkoşa, Kıbrıs.